

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR JULIEN ST-JEAN

MISE EN ÉVIDENCE DE GÈNES DE VIRULENCE CHEZ LA BACTÉRIE
Actinobacillus pleuropneumoniae PAR LA MÉTHODE STM (SIGNATURE-
TAGGED MUTAGENESIS)

SEPTEMBRE 2001

2059

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

La bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) cause de nombreuses épidémies de pleuropneumonie (une infection respiratoire très contagieuse) chez le porc au Québec, mais aussi ailleurs dans le monde. On sait maintenant que les facteurs de virulence dont l'expression s'opère exclusivement *in vivo* chez l'hôte sont théoriquement impossibles à isoler par les méthodes conventionnelles de génétique moléculaire puisque celles-ci ne permettent que la sélection et l'expression *in vitro*. Pour pallier à cet impondérable, nous avons décidé d'utiliser une méthode particulière nommée STM ou signature-tagged mutagenesis. STM fait appel à un transposon (mutagenèse insertionnelle) marqué d'une séquence-oligo signature unique de 21 paires de bases (pbs) afin d'inactiver des gènes essentiels à la croissance bactérienne dans l'hôte. Au total, 16 vecteurs plasmidiques de type pLOF/Km mini-tn10 contenant chacun une signature différente ont été construits. Lors d'une mutagenèse mettant en contact un transposon marqué et la bactérie étudiée (App), le transposon s'insère dans le génome bactérien de façon aléatoire et peut ainsi inactiver un gène donné. Les mutants sont ensuite soumis à une ronde de criblage lors de l'infection des souris. Cette technologie fonctionne par sélection négative car elle permet de mettre en évidence, d'une façon indirecte, des mutants qui ne peuvent croître *in vivo*, c'est-à-dire dans la souris, possédant ainsi un gène essentiel à l'infection inactivé par l'insertion d'un transposon. Chaque mutant est marqué par une séquence-oligo qui permet de retracer les bactéries avirulentes par PCR après l'infection des souris. Avec STM, il est ainsi possible d'isoler et d'étudier plus en profondeur des gènes qui sont essentiels à la survie d'App dans un modèle animal. Au total, 17 mutants à virulence atténuée ont été

identifiés en utilisant cette technique. Tous les mutants obtenus ont été sous-clonés et sont présentement en séquençage.

REMERCIEMENTS

Beaucoup de personnes ont été impliquées dans le cheminement que j'ai suivi pour aboutir jusqu'ici. Tout d'abord, j'aimerais remercier mes collègues étudiants et/ou de laboratoire : Amélie St-Arneault, Julie Provencher, Nancy Perreault et Luc Gagnon. Grâce à leur dynamisme et leur énergie, j'ai conservé l'envie de travailler et de me dépasser. Leur support a aussi été très apprécié lors des moments plus laborieux que j'ai traversé durant la réalisation de mon projet. J'aimerais aussi remercier les Drs Roger C. Levesque et Dario Lehoux pour nous avoir aidé à démarrer le projet STM. Leur contribution et leurs conseils nous ont permis de progresser rapidement et de mener le projet à terme. Finalement, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Marc Sirois, non seulement pour m'avoir permis de faire une maîtrise dans son laboratoire, mais aussi pour m'avoir fait découvrir et aimer la recherche et la biologie moléculaire ainsi que leurs subtilités. J'entreprends présentement un doctorat dans ce domaine et c'est avec enthousiasme que j'entrevois mon avenir en recherche!

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	vii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	viii
INTRODUCTION.....	1
1. LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET LES MICROORGANISMES	1
2. LES NOUVELLES APPROCHES EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	2
2.1 Le criblage immunologique différentiel	3
2.2 IVET.....	4
2.3 STM	6
3. LES PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES D' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	7
4. LES PRINCIPAUX FACTEURS DE VIRULENCE D'APP.....	9
4.1 La capsule.....	9
4.2 Les LPS	9
4.3 Les protéines membranaires externes	10
4.4 Les exotoxines	11
4.5 Autres facteurs de virulence.....	15
5. LA PATHOGÉNICITÉ D'APP	16
5.1 Les symptômes et les lésions	16
5.2 La vaccination.....	16

6. PRINCIPE DU STM	18
6.1 Les caractéristiques de STM	19
6.2 La transposition	22
6.3 Le criblage	25
MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
MATÉRIEL ET MÉTHODES (COMPLÉMENT)	37
RÉSULTATS	47
CONCLUSION	53
BIBLIOGRAPHIE	63

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1. Représentation schématique des deux vecteurs pIVET.....	6
Figure 2. Organisation génétique des opérons <i>apx</i>	13
Figure 3. Illustration du plasmide pLOF/Km mini-tn10	21
Figure 4. Emplacement des amorces pour l'amplification des "tags".....	24
Figure 5. Southern blot	25
Figure 6. Représentation schématique du vecteur pUC18 <i>NotI</i>	28
Figure 7. Clonage de la cassette <i>NotI</i> à l'intérieur du vecteur pLOFΔ <i>NotI</i>	31
Figure 8. PCR : groupes <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	50
Tableau 1. Séquences d'ADN des oligonucléotides synthétisés pour STM.....	29
Tableau 2. Principaux avantages et inconvénients de la technique STM.....	58

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

App : *Actinobacillus pleuropneumoniae*

STM : “signature-tagged mutagenesis”

PCR : “polymerase chain reaction” (réaction de polymérisation en chaîne)

ADN : acide désoxyribonucléique

IVET : “*in vivo* expression technology”

β -NAD : β -nicotinamide adénine dinucléotide

LPS : lipopolysaccharides

OMP : “outer membrane protein” (protéine membranaire externe)

RTX : “repeats in the structural toxin”

SOD : superoxide dismutase

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

cat : chloramphénicol acétyl transférase

pbs : paires de bases

kpb : kilopaire(s) de base(s)

kDa : kilodalton(s)

T_m : température de fusion

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

dNTP : nucléotide

NEB : New England Biolabs

Roche : Roche Diagnostics

DMSO : diméthyl sulfoxyde

BHI : “ brain heart infusion”

TSA: “ tryptic soy agar ”

TSB: “ tryptic soy broth ”

U: unités

SAP: “shrimp alkaline phosphatase” (phosphatase alcaline de crevette)

NaI^r: résistance à l’acide nalidixique

NaCl: chlorure de sodium

MgSO₄: sulfate de magnésium

PBS: “phosphate buffer saline”

TE: tris-EDTA

HCl: acide chlorydrique

EDTA: éthylène-diaminetétracétate

GCG: “Genetics Computer Group”

BBL: Baltimore Biological Laboratory

INTRODUCTION

1. La biologie moléculaire et les microorganismes

Depuis déjà plusieurs dizaines d'années, des chercheurs tentent de comprendre et d'élucider les mécanismes de fonctionnement d'une multitude d'organismes pathogènes, qu'ils soient multicellulaires, bactériens ou même viraux. La compréhension des modes de fonctionnement de ces organismes permettrait de développer des alternatives précises pour contrer ou contrôler les parasites auxquels nous faisons face. C'est au cours des années 70 que les concepts rattachés à la biologie moléculaire et à la génétique ont commencé à être exploités. Les scientifiques ont alors rapidement réalisé que l'ADN, les bactéries et les plasmides pouvaient leur servir d'outils précieux dans le but de manipuler les microorganismes et de décortiquer le bagage génétique de ces derniers. Depuis, des méthodes de plus en plus performantes et élaborées n'ont cessé d'être mises sur pied et la biologie moléculaire joue maintenant un rôle de premier plan au niveau de la recherche en infectiologie.

Les premiers dispositifs utilisés pour manipuler les bactéries se sont avérés être relativement efficaces. Ils rendaient possibles le clonage des gènes, l'amplification de ceux-ci, par PCR, et l'hybridation, à l'aide de sondes, pour ne nommer que ceux-là. Cependant, ils ne tenaient pas compte d'une hypothèse jusqu'à ce jour insoupçonnée : chez la majorité des bactéries et autres microorganismes pathogènes ou non, les gènes exprimés *in vitro* diffèrent sensiblement des gènes exprimés *in vivo* (22). En effet, les

techniques utilisant des conditions *in vitro* contribuent grandement à la compréhension de la pathogénèse bactérienne, mais habituellement elles ne parviennent pas à reproduire l'environnement complexe qui règne durant l'infection du pathogène. L'information acquise par ces méthodes est donc assez limitée. L'identification de facteurs utilisés par la bactérie pour coloniser son hôte et résister à ses mécanismes de défenses (facteurs de virulence au sens large) est un prérequis à une meilleure compréhension de la pathogénie de la maladie étudiée et à l'atténuation contrôlée de la virulence de futures souches vaccinales. L'identification et la caractérisation des gènes qui influencent la progression de l'infection sont impératives à la compréhension des mécanismes de virulence de la bactérie en question. Plusieurs de ces gènes sont activés seulement lorsqu'ils se trouvent dans un environnement approprié, souvent en réponse à des signaux qui proviennent de l'hôte, et ne sont exprimés que lorsqu'ils sont requis (les récepteurs de fer par exemple (17)). Les gènes associés à de tels facteurs de virulence sont donc théoriquement impossibles à isoler car les techniques conventionnelles de la génétique moléculaire qui étaient couramment utilisées en laboratoire ne permettent que la sélection et l'expression *in vitro*; par conséquent, l'expression différentielle de tels gènes a poussé les scientifiques à mettre au point de nouveaux moyens de criblage.

2. Les nouvelles approches en biologie moléculaire

Au cours des deux dernières décennies, une variété de méthodes de sélection et de criblage faisant appel à la biologie moléculaire ont été développées. À l'aide de celles-ci, il est maintenant possible d'identifier et de déterminer les fonctions des facteurs de

virulence majeurs de plusieurs pathogènes, en particulier des bactéries. Ces techniques permettent notamment de distinguer les gènes s'exprimant exclusivement *in vivo* des gènes s'exprimant à la fois *in vivo* et *in vitro*. Parmi celles-ci, notons les approches faisant appel à l'ADN complémentaire, les fusions transcriptionnelles, le criblage immunologique différentiel, la technologie de l'hybridation différentielle ou soustractive ainsi que les méthodes IVET (*in vivo* expression technology) et STM (signature-tagged mutagenesis). Les deux dernières méthodes, IVET et STM, sont dans une classe à part puisqu'elles nécessitent l'utilisation d'animaux vivants et proposent donc des moyens de criblage *in vivo* (31). Elles sont par conséquent très puissantes pour identifier des gènes qui agissent à différentes étapes d'une infection (22, 23). Bien qu'elles soient difficiles à mettre au point, ces méthodes présentent de nombreux avantages par rapport aux techniques biochimiques et moléculaires conventionnelles.

2.1 Le criblage immunologique différentiel

Des techniques mentionnées ci-haut, trois sont particulièrement intéressantes et méritent d'être abordées : le criblage immunologique différentiel, IVET et STM. Tout d'abord, le criblage immunologique différentiel a la particularité de pouvoir distinguer les protéines immunogéniques exprimées *in vivo* de celles exprimées *in vitro*. La méthode est basée sur la supposition que les sérums provenant d'animaux infectés contiennent des anticorps qui réagissent contre les antigènes exprimés *in vivo*, alors que les sérums provenant d'animaux immunisés par des cultures de bactéries tuées contiennent seulement des anticorps dirigés contre les protéines exprimées *in vitro* (45). Brièvement, une banque

génomique d'expression (construite dans un bactériophage) de la bactérie étudiée est étalée sur pétri puis transférée sur des membranes de nitrocellulose en deux exemplaires. Chacune des membranes est ensuite traitée avec un des deux sérums et révélée par colorimétrie. Puisque le sérum de porc immunisé contient des anticorps dirigés contre des bactéries cultivées *in vitro*, la membrane incubée avec ce sérum mettra en évidence les plages de lyse qui contiendront des antigènes exprimés *in vitro*. Dans le même ordre d'idées, la membrane incubée avec le sérum de porc infecté, ou convalescent à la maladie, mettra en évidence les plages de lyse qui contiendront des antigènes exprimés *in vivo*. Les gènes exprimés exclusivement *in vivo* sont donc ceux qui réagissent avec le sérum de porc convalescent, et non avec le sérum de porc immunisé. Bien que les immunogènes dont l'expression s'opère seulement *in vivo* ne représentent pas obligatoirement des facteurs de virulence, leur immunogénicité demeure potentiellement importante pour la fabrication éventuelle de vaccins.

2.2 IVET

La technique IVET, quant à elle, est une trappe à promoteur conçue pour reconnaître des gènes dont l'expression est induite par un environnement spécifique, c'est-à-dire par un hôte animal ou par des cellules en culture (20). Elle est donc basée sur l'expression de fusions transcriptionnelles entre des séquences clonées possédant une fonction promotrice, un gène essentiel et un gène rapporteur. IVET fait appel à un plasmide-vecteur qui contient un site de clonage situé en amont du gène essentiel et qui est dépourvu de promoteur. Il existe deux plasmides de base pour mener l'expérience,

pIVET1 et pIVET8 (figure 1), mais ils peuvent facilement être modifiés selon la bactérie étudiée et le modèle animal utilisé. Le plasmide pIVET8, par exemple, est composé, dans l'ordre 5'-3' et de façon contiguë, des gènes sans promoteur *cat* (chloramphénicol acetyl transférase), *lacZ* et *lacY*. Brièvement, des fragments d'ADN chromosomique de la bactérie étudiée sont clonés dans le site de clonage de pIVET8 (site *Bgl*II) et une fusion transcriptionnelle s'opère. Si le fragment cloné possède des fonctions promotrices, il contrôlera l'expression des gènes situés en aval du site de clonage, soient *cat*, *lacZ* et *lacY*. Une fois la banque génomique terminée, celle-ci est transformée dans la souche bactérienne à l'étude. Les bactéries résultantes sont ensuite inoculées à un modèle animal qui subira un traitement au chloramphénicol. Les bactéries survivantes à l'infection seront celles dont le plasmide pIVET8 contient un promoteur inductible *in vivo* puisque le gène de résistance au chloramphénicol se devait d'être exprimé pour que la bactérie survive au traitement antibiotique. Finalement, pour savoir si les bactéries survivantes possèdent un promoteur qui est induit exclusivement *in vivo*, ces dernières sont étalées sur un milieu de culture qui permet la sélection des bactéries lactose(+) par rapport aux bactéries lactose(-) (milieu MacConkey). Les promoteurs qui s'expriment seulement *in vivo* fourniront à la bactérie un phénotype lactose(-) puisqu'ils ne seront pas induits et qu'ils ne conduiront pas à l'expression des gènes *lacZ* et *lacY*. Ce genre de travail avec IVET a été réalisé avec succès chez les bactéries *Salmonella typhimurium* (20), *Pseudomonas aeruginosa* (51) et même chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) (16).

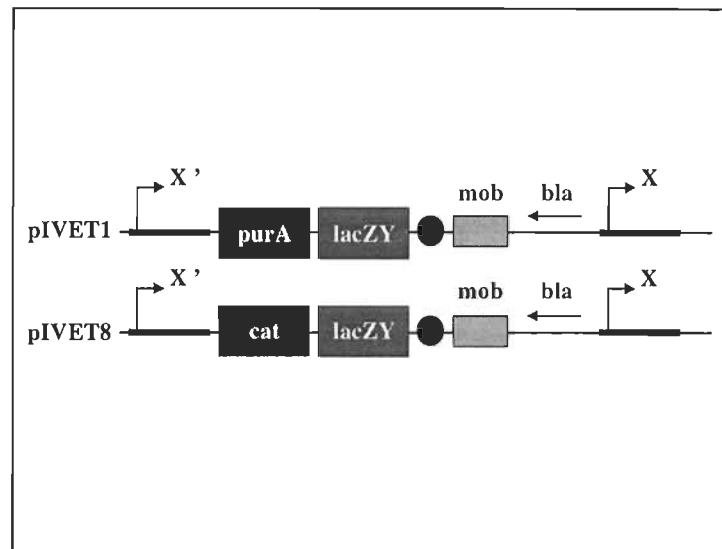


Figure 1. Représentation schématique des deux vecteurs de base pouvant être employés pour IVET. Cat : chloramphénicol acétyl transférase; purA : gène de synthèse de purines; mob : gène de mobilisation; bla : gène de résistance à l'ampicilline.

2.3 STM

La troisième technique qui permet le criblage de gènes qui sont activés spécifiquement *in vivo* est STM. C'est d'ailleurs cette méthode qui fut employée pour la mise en évidence de gènes de virulence chez la bactérie App. STM fait appel à un transposon (mutagenèse insertionnelle) marqué d'une séquence-oligo unique afin d'inactiver des gènes essentiels à la croissance bactérienne dans l'hôte. Cette technologie fonctionne par sélection négative car elle permet de mettre en évidence, d'une façon indirecte, des mutants qui ne peuvent croître *in vivo* et qui possèdent donc un gène essentiel inactivé par l'insertion d'un transposon (42). Chaque mutant est marqué par un "tag" (séquence-oligo) qui permet de

retracer les bactéries d'intérêt après l'infection. Les principes et les détails qui se rapportent à STM seront élaborés un peu plus loin.

3. Les principales caractéristiques d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

La bactérie investiguée dans le cadre de la présente étude est désignée *Actinobacillus pleuropneumoniae* souche 4074 (sérotipe 1). Elle est l'agent causal de la pleuropneumonie porcine, une infection respiratoire très contagieuse. La pleuropneumonie porcine est une maladie qui cause des pertes économiques importantes au Québec, mais aussi à la grandeur de la planète, c'est-à-dire partout où l'on retrouve une activité intense d'élevage (11). Une enquête réalisée aux États-Unis montre que 48,5% des éleveurs ont été confrontés à des problèmes de pleuropneumonie dans les 12 mois précédant le sondage. Au Canada, les pertes directes (mortalité qui peut atteindre 10% ou plus) ou indirectes (coût du traitement, ralentissement de la croissance, etc.) résultant de cette maladie sont estimées à 40 millions de dollars par an. La maladie se présente sous deux formes : aiguë et chronique. La forme aiguë de la maladie provoque des taux de mortalité élevés, dans les 24 à 48 heures, tandis que la forme chronique laisse des lésions aux poumons, ayant comme conséquence un rendement de croissance plus faible et une susceptibilité accrue aux infections secondaires. Au niveau pulmonaire, la maladie est caractérisée par l'apparition de lésions hémorragiques et nécrosantes. La pleurésie fibrineuse et une pneumonie avec une présence d'abcès sont des problèmes qui sont davantage associés à la forme chronique de la maladie (44).

App fait partie de la famille des *Pasteurellaceae* qui est représentée par une espèce pathogène humaine bien connue : *Haemophilus influenzae*. C'est une bactérie coccobacille Gram-négative, anaérobie facultative et possédant une capsule. Elle constitue un organisme intéressant puisqu'elle présente plusieurs formes de facteurs de pathogénicité. Parmi ceux-ci, la capsule, les lipopolysaccharides (LPS), les protéines membranaires externes et les exotoxines suscitent une attention plus particulière. App possède une spécificité d'hôte absolue pour l'espèce porcine (48) et tous les sérotypes peuvent déclencher la même maladie, mais à divers degrés de sévérité.

Au total, il est possible de distinguer chez App douze sérotypes qui varient selon les différences antigéniques des polysaccharides capsulaires (32). Les sérotypes 1 et 5 sont prédominants au Québec et aux États-Unis alors que le sérotype 2 est surtout présent en Europe et en Asie. De nombreuses études ont démontré que la virulence variait au gré des sérotypes, les sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11 étant les plus virulents. Parmi les souches connues d'App, on dénombre aussi deux biotypes, soient 1 et 2. Les souches du biotype 1 sont dépendantes du β -NAD (β -nicotinamide adénine dinucléotide ou facteur V) et celles du biotype 2, qui sont moins communes, peuvent survivre sans apport de β -NAD (12).

4. Les principaux facteurs de virulence d'App

4.1 La capsule

Comme il a déjà été mentionné précédemment, plusieurs facteurs de virulence semblent influencer la pathogénicité d'App. D'abord, les polysaccharides capsulaires jouent un rôle déterminant lors de la mise en place de l'infection (41). Ils ont été associés aux mécanismes anti-phagocytaires de la bactérie et constitueraient le bouclier principal contre les mécanismes de défenses humorales de l'hôte (48). La capsule d'App varie entre 80 et 230 nm d'épaisseur selon les sérotypes (26). Bien qu'il ait été rapporté que des capsules purifiées d'App étaient dépourvues de toute activité biologique, des études *in vivo* ont clairement démontré que les souches qui produisent plus de polysaccharides capsulaires sont plus virulentes que celles qui en produisent moins et que, lorsqu'il n'y a pas de capsule, les souches sont pratiquement avirulentes (39, 52).

4.2 Les LPS

Les LPS sont à la base d'un autre mécanisme à partir duquel les bactéries peuvent s'installer et causer la maladie. Ce sont des molécules complexes qui comportent trois parties : le lipide A, le noyau et l'antigène O. L'antigène O est quant à lui composé de chaînes répétées de polysaccharides, lesquelles permettent de définir un profil de LPS lisse (sérotypes 2, 4, 5 et 7), partiellement rugueux (sérotypes 1 et 5) ou rugueux (sérotypes 3 et 6) (34). Bien que la composition des chaînes d'antigène O soit spécifique à chacun des sérotypes, leur longueur peut varier d'une souche à l'autre. Malgré que

l'inoculation intratrachéale de LPS induise des lésions pulmonaires *in vivo*, aucune trace de nécrose ou d'hémorragie n'a été notée (34). Il semblerait donc que les LPS agissent conjointement avec les exotoxines pour causer les lésions typiques qui sont associées à la pleuropneumonie porcine. Récemment, il a aussi été prouvé que les LPS d'App contribuent à l'adhérence des bactéries aux anneaux trachéaux et au mucus respiratoire du porc (35).

4.3 Les protéines membranaires externes

Plusieurs protéines membranaires externes (ou OMP pour outer membrane proteins) ont été décrites chez App et certaines ont été associées avec l'induction d'une réponse immunitaire protectrice (48). Les OMP comprennent notamment les récepteurs de transferrines porcines qui sont synthétisés en conditions limitantes en fer. Des anticorps dirigés contre ces protéines ont d'ailleurs été retrouvés dans des sérums de porcs convalescents, indiquant qu'elles sont produites *in vivo* (34). De plus, ces mêmes anticorps joueraient un rôle important lors du phénomène d'opsonisation qui mène à la phagocytose par les leucocytes porcins. L'arrangement génétique de ces récepteurs comprend deux gènes organisés à l'intérieur d'un seul opéron. Dans l'ordre, les gènes *thpB* et *thpA* codent pour les protéines Tbp2 et Tbp1 qui possèdent des poids moléculaires respectifs de 59,8 à 65,5 kDa (selon la modification post-traductionnelle subie) et 102,2 kDa (17). La protéine Tbp1 est une protéine transmembranaire et la protéine Tbp2 est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe grâce à sa partie lipidique. Ces deux protéines semblent agir en synergie pour capter le fer lié à la

transferrine. La protéine Tbp1 permettrait ensuite le transport du fer au travers de la membrane externe, puis sa fixation sur une protéine périplasmique qui serait analogue à la protéine TonB de *E. coli*. Le répresseur Fur, situé en amont de l'opéron *tbp*, contrôle le taux de transcription des gènes *tbp* selon la disponibilité du fer dans l'environnement de la bactérie. L'organisation de ces gènes est semblable à celle des gènes de récepteurs de transferrines retrouvés chez *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae* et *H. influenzae* (18), ce qui laisse croire que leur mode de fonctionnement est similaire.

La spécificité de la liaison des récepteurs avec les transferrines porcines est une des raisons importantes qui explique l'exclusivité d'App pour son hôte. La capacité limitée d'App d'infecter des animaux autres que le porc pourrait donc être due au fait que la bactérie est inapte à utiliser des transferrines qui proviennent d'une source différente du porc. Récemment, une nouvelle classe de récepteurs de type ferrichrome a été décrite chez App, mais leur rôle dans la virulence reste toujours à déterminer.

4.4 Les exotoxines

Enfin, le facteur de virulence le plus étudié et qui suscite le plus d'intérêt chez App est sans contredit représenté par les exotoxines. Ce sont en fait des protéines hémolysines qui ont la propriété de pouvoir former des pores (dont la taille est estimée à 2 nm) dans la membrane cellulaire des globules rouges et d'autres cellules (47). App produit trois de ces toxines. Elles appartiennent à la famille des toxines RTX (repeats in the structural toxin) (47) car elles présentent des séquences répétées, riches en glycine et constituées de

neuf acides aminés. Les protéines de la famille RTX sont aussi retrouvées chez plusieurs bactéries Gram-négatives pathogènes. Chez *App*, ces toxines sont désignées *ApxI*, *ApxII* et *ApxIII*. Les deux premières possèdent une activité cytotoxique et hémolytique, alors que *Apx III* est uniquement cytotoxique. Des trois toxines, c'est *ApxI* qui cause le plus de dommages et qui est reconnue pour être la plus virulente. Les sérotypes qui la produisent (1, 5, 9, 10 et 11) sont d'ailleurs les plus virulents et sont fréquemment associés aux épidémies à haute incidence de mortalité. Les toxines *Apx* ont la capacité de déclencher un choc oxydatif (production de radicaux oxygène) et d'inactiver les neutrophiles et les macrophages alvéolaires du poumon. Il semble qu'elles soient importantes dans la pathogénicité d'*App* puisqu'elles inactiveraient les défenses immunitaires de l'hôte et permettraient à la bactérie de s'établir dans ce dernier (12). Leur mode de fonctionnement exact demeure cependant encore mal compris.

Les toxines RTX sont codées par un opéron de quatre gènes contigus organisés dans l'ordre suivant : *C*, *A*, *B*, et *D* (28) (figure 2). Le gène *C* code pour une protéine qui est responsable de la conversion cytoplasmique de la toxine inactive, codée par le gène *A*, en toxine active. Les gènes *B* et *D* codent quant à eux pour des protéines impliquées dans la sécrétion des toxines. Une caractéristique particulière d'*App* est que d'une souche à l'autre on retrouve des combinaisons différentes de toxines synthétisées et/ou sécrétées. Chez certains sérotypes, il existe des opérons *apxI* et/ou *apxII* tronqués qui ne contiennent que deux gènes (46). Par exemple, dans l'opéron *apxII*, seuls les gènes *C* et *A* sont présents. La toxine est donc produite, mais la bactérie doit utiliser les protéines *B* et *D* de l'opéron *apxI* ou *apxIII* afin d'exporter ses exotoxines dans le milieu environnant.

Dans le même ordre d'idées, l'opéron *apxI* est parfois tronqué, où seuls les gènes *B* et *D* sont présents. La bactérie sécrète alors les toxines synthétisées par l'opéron *apxII* et/ou *apxIII* (13).

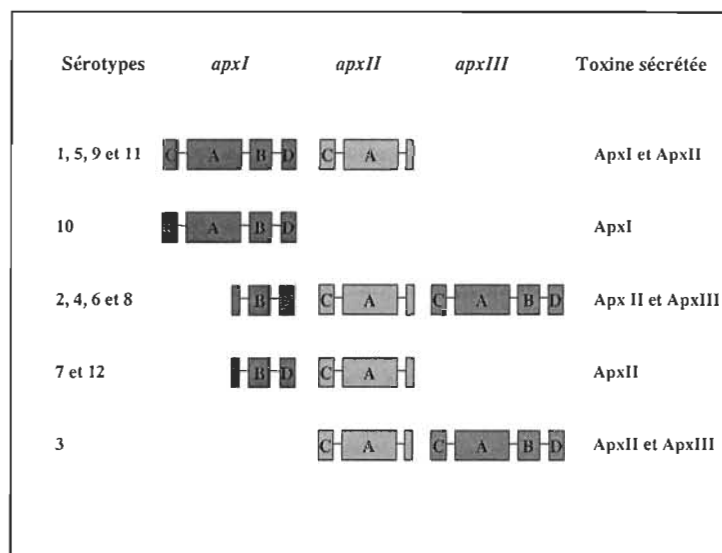


Figure 2. Représentation schématique de l'organisation génétique des opérons *apx* selon le sérotype rencontré d'App.

ApxI est la toxine d'App qui est la plus virulente. Elle est fortement hémolytique et cytotoxique pour les cellules phagocytaires comme les macrophages alvéolaires et les neutrophiles. Elle présente une masse moléculaire de 105 kDa et est produite par les sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11 (12). Elle est codée par l'opéron *apxI* qui contient les quatre gènes RTX, soient *C*, *A*, *B* et *D*. Les sérotypes 2, 4, 6, 7, 8 et 12 ne possèdent pas les gènes *C* et *A* de l'opéron *apxI* et ne produisent donc pas la toxine ApxI. Ils disposent plutôt d'un opéron *apxI* tronqué qui ne contient que les gènes *B* et *D*. Ils peuvent ainsi exporter les toxines qui sont synthétisées soit par l'opéron *apxII* ou soit par l'opéron *apxIII*.

ApxII est faiblement hémolytique et cytotoxique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (12). Son poids moléculaire est estimé à 105 kDa et elle est produite par tous les sérotypes, sauf le 10. L'opéron *apxII* est toujours tronqué et on y retrouve seulement les gènes *C* et *A*. La toxine peut ainsi être produite, mais la sécrétion est effectuée par les protéines *B* et *D* de l'opéron *apxI*, qui sont présentes chez tous les sérotypes, sauf le 3.

Finalement, ApxIII n'est pas hémolytique, mais fortement cytotoxique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles. Elle est aussi connue sous le nom de pleurotoxine (40). Cette protéine a un poids moléculaire de 120 kDa et est exprimée chez les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8. Elle n'existe que chez les souches de biotype 1 et est absente chez le biotype 2 (12). Elle est codée par l'opéron *apxIII* qui possède toujours les quatre gènes RTX *C*, *A*, *B* et *D*. En résumé, tous ces faits démontrent que chacune des toxines Apx peut potentiellement induire des lésions pulmonaires et contribuer à l'invasion d'App en exerçant ses propriétés antiphagocytaires chez le porc. D'ailleurs, Jansen et son équipe ont démontré qu'en inactivant les toxines ApxI et ApxII par mutagenèse-transposition, App devenait incapable de provoquer un choc oxydatif chez les neutrophiles et de les détruire (28).

4.5 Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence mineurs sont aussi présents chez App. Par exemple, des structures semblables à des pili ont déjà été retrouvées à l'intérieur de phagosomes de leucocytes suite à l'internalisation de la bactérie. Récemment, des pili répartis à la surface de la bactérie ont été décrits chez des souches fraîches d'App ayant été cultivées sur des milieux de culture contenant du sang (50). Ces structures serviraient principalement à l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales de la trachée et des poumons de l'hôte. Un homologue du gène *hlyX* a aussi été identifié chez App (47). La protéine résultante est considérée comme un facteur de virulence puisqu'elle confère à la bactérie un phénotype fortement hémolytique et qu'elle conduit à une réaction de CAMP (14). D'autres protéines peuvent par ailleurs s'ajouter à la liste des facteurs responsables de l'invasion et de la virulence d'App. Parmi celles-ci, notons les protéases et la superoxide dismutase. Les protéases possèdent une activité protéolytique qui leur permet de dégrader les IgA porcins ainsi que l'hémoglobine humain et bovin. Leur mécanisme de clivage protéolytique aurait un certain rôle à jouer dans l'apparition de lésions pulmonaires chez l'hôte (33). App fait finalement partie du nombre grandissant de bactéries chez qui une activité SOD a été observée. L'extrémité N-terminale de la protéine laisse croire que l'emplacement de l'enzyme serait extra-cytosolique, ce qui protégerait la bactérie des superoxides de l'environnement plutôt que des radicaux endogènes générés lors du métabolisme aérobie (29). En plus de pouvoir provoquer un choc oxydatif dans les cellules phagocytaires, App peut survivre dans les phagosomes de celles-ci en éliminant les radicaux libres présents à l'aide de la SOD.

5. La pathogénicité d'App

5.1 Les symptômes et les lésions

Le pouvoir pathogène d'App repose sur de nombreux facteurs de virulence, ce qui peut expliquer la difficulté d'obtenir une vaccination très efficace à l'aide de vaccins sous-unitaires. Expérimentalement, la constitution des lésions microscopiques est très rapide puisque 90 minutes après une inoculation par voie intranasale, des lésions microscopiques peuvent être mises en évidence (19). Ces lésions ont une taille de 1 à 2 mm et peuvent atteindre 5 mm après 180 minutes. Les septums inter alvéolaires sont épaissis du fait d'une congestion des capillaires, des lésions hémorragiques sont visibles et les alvéoles sont remplies d'un exsudat éosinophile contenant des érythrocytes, des macrophages, de la fibrine et quelques neutrophiles. L'évolution rapide de l'infection ainsi que la présence d'hémorragies pulmonaires et d'une pleurésie fibrineuse suggèrent l'action de toxines et de médiateurs de l'inflammation (19).

5.2 La vaccination

Malgré les efforts importants investis jusqu'à présent pour développer un vaccin contre la pleuropneumonie porcine, aucune cure permettant de contrôler la maladie efficacement n'a encore été trouvée (46). Des essais de vaccination ont été tentés, mais les résultats ne se sont pas avérés très concluants. Les porcs immunisés avec des cellules entières inactivées ou à l'aide de fractions de bactéries telles que capsules, LPS et OMP ne sont pas protégés contre l'infection. Bien qu'une telle immunisation puisse protéger contre la

mortalité et la morbidité, les animaux qui survivent à la maladie deviennent des porteurs de la bactérie et peuvent éventuellement former des foyers infectieux pour les autres animaux. Les porcs survivants à l'infection deviennent toutefois immunisés contre les souches du même sérotype et une protection croisée a aussi été observée entre certains sérotypes (6). Les vaccins commerciaux produits jusqu'ici n'ont pas fourni les résultats escomptés. Ils présentent en fait trois désavantages majeurs qui doivent être corrigés ou améliorés afin d'offrir une meilleure protection. Ils démontrent une faible prévention des lésions pulmonaires, un manque de protection croisée entre les différents sérotypes et une incapacité de prévenir l'état de porteur des animaux potentiellement infectieux (25, 46). Dernièrement, un nouveau vaccin commercial contre la pleuropneumonie porcine a cependant été mis sur pied. Il contient des extraits de toxines Apx et une protéine membranaire externe de 42 kDa. Bien que la protection offerte par ce vaccin ne soit pas totale, elle est beaucoup plus complète que ce que les autres vaccins pouvaient offrir et elle n'est spécifique à aucun sérotype. Des essais ont d'ailleurs confirmé que ce vaccin entraînait une réduction des symptômes cliniques et des lésions pulmonaires dus à la pleuropneumonie aiguë et chronique (19).

Il est maintenant évident qu'une meilleure compréhension de la pathogénicité d'App est requise afin de développer des outils nouveaux et efficaces qui permettraient de contrôler et de prévenir la pleuropneumonie porcine de façon efficace (53). Les techniques qui permettent de mettre en évidence des gènes qui s'expriment exclusivement *in vivo* sont d'ailleurs très intéressantes puisqu'elles constituent des outils capables de détecter des gènes nouveaux ou insoupçonnés. Bien que de nombreux facteurs de virulence aient déjà

été identifiés chez App, il est raisonnable de croire à l'existence de facteurs de virulence supplémentaires qui seraient exprimés spécifiquement *in vivo*. L'hypothèse de l'existence de gènes s'exprimant seulement *in vivo* est attrayante parce que plusieurs phénomènes observés au cours des infections en général, et de la pleuropneumonie porcine en particulier, demeurent inexpliqués. Par exemple, des pili ont déjà été décrits chez App, mais seulement chez des souches fraîches (un ou deux passages) et cultivées sur gélose au sang (50). Divers signaux chimiques *in vivo* provenant du système respiratoire du porc pourraient être à l'origine de l'expression de ce type de structures. La découverte de tels gènes, qui ne s'expriment que dans des conditions particulières, pourrait ainsi ouvrir la porte à l'élaboration et à la conception de nouveaux vaccins ou de nouvelles molécules antimicrobiennes.

6. Principe du STM

La technique choisie afin de retracer les gènes dont l'expression s'opère exclusivement *in vivo* chez la bactérie App souche 4074 s'appelle STM. La méthode repose sur l'utilisation de bactéries dont le chromosome a été muté suite à l'insertion d'un transposon. Un transposon est en fait un segment d'ADN qui peut s'intégrer de façon aléatoire à l'intérieur d'une autre séquence d'ADN. C'est aussi l'outil de base de la méthode STM. Comme chacun des transposons est marqué par une séquence-oligo unique (ou "tag") de 21 paires de bases (pbs), chacun des mutants peut être identifié individuellement par PCR. Donc, par mutagenèse, le transposon saute à l'intérieur du génome de la bactérie d'intérêt et, de cette manière, on inactive un gène au hasard, de

façon complètement aléatoire. C'est ce qu'on appelle une transposition. Chaque mutant ainsi obtenu est ensuite inoculé à une souris et s'il ne cause pas la maladie, on peut émettre l'hypothèse que le gène inactivé par le transposon est essentiel à la survie de la bactérie dans l'hôte. Ce sont ces gènes qui nous intéressent et qui seront davantage étudiés. Le marquage des transposons permet d'inclure plusieurs mutants simultanément lors des rondes de criblage dans les souris. Si les transposons n'étaient pas uniques, il serait impossible de différencier les mutants les uns par rapport aux autres et les infections de souris auraient lieu avec un seul mutant à la fois.

6.1 Les caractéristiques de STM

STM se démarque des autres méthodes de mutagenèse par transposition puisque ces dernières sont limitées par le fait que chaque mutant doit être testé individuellement afin d'identifier un phénotype atténué (10). Deux prérequis sont nécessaires pour mener la technique à terme (21). Tout d'abord, l'organisme étudié doit être haploïde, c'est-à-dire qu'il ne doit contenir qu'une seule copie de génome. Des méthodes semblables à STM ont aussi été mises au point pour l'étude d'organismes diploïdes, mais elles sont beaucoup plus complexes puisque les deux copies du gène visé doivent être inactivées. Ce problème n'est pas rencontré chez les organismes procaryotes puisque le génome de ceux-ci ne contient qu'une seule copie de chaque gène. Le deuxième prérequis impose un système de criblage efficace. Les modèles animaux comme la souris, le rat et le lapin sont des systèmes de criblage très utilisés dans ce genre de technique parce qu'ils fournissent un environnement qui reproduit fidèlement les conditions *in vivo* retrouvées

chez l'hôte naturel de l'organisme étudié. Plus la voie d'inoculation se rapproche de celle rencontrée dans la nature, plus les résultats obtenus seront fiables et reproductibles. Par exemple, Polissi et son équipe ont expérimenté STM chez la bactérie *Streptococcus pneumoniae* par inoculation intranasale. Tous les mutants atténués obtenus par pneumonie ont ensuite été testés par septicémie et ils n'ont pas tous été confirmés, ce qui indique qu'il existe des facteurs de virulence qui sont spécifiques à la pneumonie (37). Des essais ont aussi été réalisés avec un système de criblage cellulaire composé de macrophages humains chez la bactérie *Brucella suis* (10). Cependant, comme l'environnement est différent de celui de l'animal et que les signaux chimiques cellulaires sont plus limités, moins de facteurs de virulence ont pu être identifiés par cette méthode (10).

L'outil de base pour entreprendre la technique STM est un plasmide de 9,7 kilopaires de bases (kpb) appelé "pLOF/Km mini-tn10" (figure 3). Le plasmide d'origine, pLOF, mesure 4,7 kpb et contient trois gènes : *bla*, *mobRP4* et *lacI^q*. Ce vecteur dérive d'un plasmide nommé pGP704. Il est pratiquement identique à pLOF sauf qu'il ne possède pas le gène *lacI^q*. Comme pLOF, il possède cependant l'origine de réplication *ori R6K*. Cette origine de réplication fait en sorte que le plasmide peut seulement se répliquer chez des souches bactériennes *E. coli* λ pir, c'est-à-dire des souches qui produisent la protéine π . Le plasmide peut être transformé dans une souche qui ne produit pas la protéine en question, mais il ne pourra se répliquer et sera éliminé. C'est pour cette raison que les plasmides pLOF et pGP704 sont désignés comme étant des vecteurs suicides (9). Le gène *bla* permet la production d'une β -lactamase qui confère la résistance aux β -

lactamines (comme l'ampicilline). Ce gène s'avère très utile lorsqu'une sélection est requise. Le gène *mobRP4* est responsable du transfert du plasmide lors du phénomène de conjugaison. Aussi, le gène *lacI* permet la production du répresseur du promoteur *P_{tac}*, situé en amont du gène de la transposase, *IS10R*. Lorsqu'il est induit par l'IPTG, *P_{tac}* devient déréprimé et conduit alors à l'expression du gène de la transposase qui est essentielle au phénomène de transposition (46).

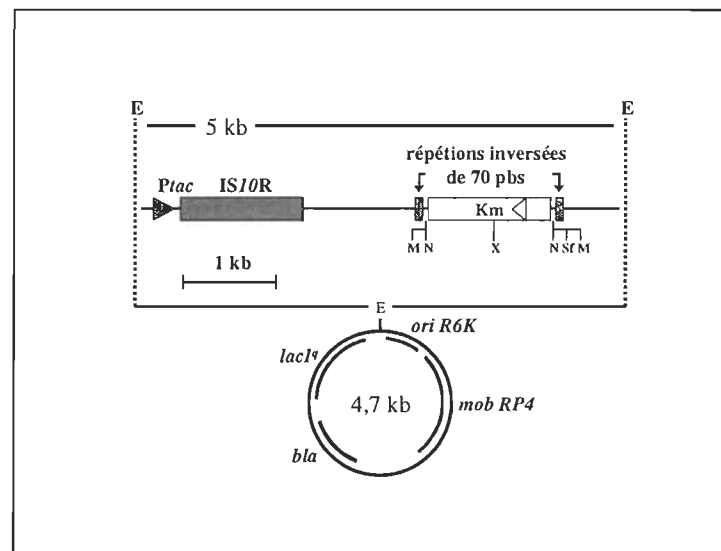


Figure 3. Illustration du plasmide pLOF/Km mini-tn10. Les sites de restriction sont désignés par les lettres suivantes: M, *Mlu*I; N, *Not*I; E, *Eco*RI; Sf, *Sfi*I; X, *Xho*I.

Au plasmide d'origine vient s'ajouter un fragment de 5 kpb pour former pLOF/Km mini-tn10 (figure 3). C'est dans cette région que l'on retrouve le gène de la transposase *IS10R* et son promoteur *P_{tac}*, ainsi que le transposon qui contient un gène de résistance à la kanamycine. Cette résistance à la kanamycine est utilisée comme marqueur de sélection lors des expérimentations avec le plasmide. Il est à noter qu'il existe d'autres marqueurs

transpositions plus efficaces. Ces mutations sont désignées *ats1* et *ats2* et réduisent de façon drastique les “hot spots”, qui sont en fait des régions d’ADN qui favorisent l’insertion du transposon (1). Selon Tascon et son équipe, le faible taux de guanines et de cytosines dans le génome d’App, soit approximativement 42%, pourrait aussi contribuer à expliquer l’absence de “hot spots” (46).

À l’intérieur du transposon, plusieurs sites de restriction sont présents. Ces sites permettent le clonage de fragments étrangers d’ADN et c’est à l’intérieur de ceux-ci que seront introduits les “tags” de 21 pbs qui serviront à l’identification éventuelle de tous les mutants. Les “tags” permettront la conception de banques de mutants possédant tous un “tag” d’identification différent.

Puisqu’il existe des amorces spécifiques à chaque “tag” (qui sont en fait un des deux brins complémentaires du “tag”) et au gène de résistance à la kanamycine, il est possible de procéder à l’identification de chacun des mutants par PCR (figure 4). Chacun des “tags” possède la même température de fusion (T_m), une région invariable afin d’optimiser les PCRs et une région variable qui permet d’obtenir des amplifications spécifiques (30).

Pour la mutagenèse, deux techniques peuvent être utilisées: la conjugaison ou l’électroporation. Quelle que soit la méthode employée, le principe demeure le même. Il consiste à introduire le vecteur à l’intérieur de la souche bactérienne que l’on veut étudier, ici App souche 4074, puis à induire l’insertion du transposon dans le génome de la bactérie (8).

pour des expériences de transposition du même genre. Des transposons portant des gènes de résistance à certains herbicides, aux sels de mercure, à l'arsenite ainsi qu'à d'autres antibiotiques sont aussi disponibles (24). On remarque finalement que l'élément mobile (ou transposon) est bordé de part et d'autre par des séquences répétées de 70 pbs qui sont essentielles au phénomène de transposition (46).

6.2 La transposition

Deux types de transposons sont disponibles dans le but d'effectuer des mutagenèses par transposition : les transposons de type Tn5 et Tn10. Cependant, aucune mutagenèse n'a déjà fonctionné chez App avec des transposons de type Tn5; soit que la transposition est tellement faible qu'elle est indétectable ou soit que le gène de résistance à la kanamycine de Tn5 ne s'exprime pas chez App (46). Il existe d'autres gènes de résistance à des antibiotiques chez les transposons de type Tn5, comme chloramphénicol, gentamycine, tétracycline et streptomycine (2), mais ils ne fournissent pas de meilleurs résultats que le gène de résistance à la kanamycine lors des mutagenèses. Un autre inconvénient du Tn5 est qu'il ne contient que très peu de sites de restriction reconnus par des enzymes qui coupent six paires de bases, ce qui diminue les possibilités de clonage (2). Le transposon utilisé pour les manipulations avec App est plutôt de type Tn10. Il dérive d'un autre transposon désigné Tn903. Il convient très bien à la mutagenèse par transposition chez App parce que son gène de résistance à la kanamycine s'y exprime et que le taux de mutants obtenus est très acceptable. Le gène de la transposase contenu dans le vecteur pLOF/Km mini-tn10 a subi préalablement deux mutations afin d'obtenir des

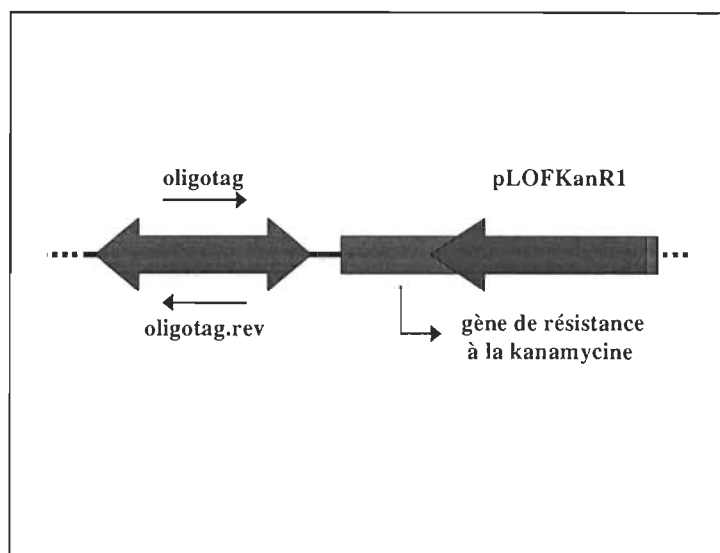


Figure 4. Schématisation de l'emplacement des amorces pour l'amplification des "tags" par PCR.

La transposition s'effectue de façon apparemment aléatoire (figure 5) (46). L'insertion du transposon provoque donc l'inactivation du gène dans lequel il se trouve et fournit du même coup un mutant identifiable par le "tag" que porte le transposon. La transposition est très stable pour deux raisons: d'une part, App 4074 ne produit pas la protéine π essentielle à la réplication du vecteur, et celui-ci est donc éliminé immédiatement après la transposition; d'autre part, le gène responsable de la transposition, celui de la transposase, est situé sur le vecteur mais à l'extérieur de l'élément mobile, ne subissant donc pas la transposition et étant éliminé en même temps que le vecteur (2). Selon Tascon et son équipe, la fréquence des mutations s'établit à 10^{-5} alors que la fréquence des conjugaisons est d'environ 10^{-4} . Aussi, 1,2% des mutants obtenus seraient dus à l'intégration complète du plasmide pLOF/Km mini-tn10 dans le génome d'App par recombinaison. Le facteur limitant de la transposition réside essentiellement dans le

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La bactérie App 4074 Nal^r a servi de souche de référence tout au long de cette étude. La souche a été obtenue suite à une sélection effectuée sur un milieu de culture contenant un gradient de concentration d'acide nalidixique. Ce mutant est en mesure de recevoir de l'ADN étranger par transformation, électroporation ou conjugaison (46, 52). Le mutant ainsi créé était cultivé de façon routinière à 37°C sur un milieu de culture BHI ("brain heart infusion"; Difco) contenant 100 µg/mL de β-NAD (Sigma Chemical Co.) et 50 µg/mL d'acide nalidixique afin de maintenir la résistance à l'antibiotique et de s'assurer de la pureté de la souche. La bactérie *E. coli* S17-1 λ pir a été utilisée comme souche donneuse lors des expériences de mutagenèse et a aussi été employée pour répliquer le plasmide contenant le transposon, soit le plasmide pLOF/Km mini-tn10. Elle a été cultivée dans du milieu de culture TSA ("tryptic soy agar"; Difco) ou TSB ("tryptic soy broth"; Difco) additionné de 100 µg/mL d'ampicilline et de 50 µg/mL de kanamycine, le vecteur contenant des gènes de résistance pour ces deux antibiotiques. Les souches DH5α et DH5α λ pir ont été utilisées pour électroporer le vecteur contenant le transposon suite à l'insertion des "tags" à l'intérieur de ce dernier. Les deux souches ont été cultivées sur un milieu TSA où les antibiotiques et réactifs appropriés ont été ajoutés aux concentrations finales suivantes, selon le vecteur que la souche contenait: ampicilline, 100 µg/mL; kanamycine, 50 µg/mL; X-Gal, 0,004% (poids/volume) et IPTG, 0,1 mM. Les deux vecteurs employés pour la mutagenèse et l'insertion des "tags" dans les transposons étaient respectivement pLOFΔNotI, qui dérive de pLOF/Km mini-tn10 et qui diffère de ce dernier par son site de restriction unique *NotI* situé en amont du gène de

pas survécu lors de l'infection. En effet, l'insertion du transposon dans un gène essentiel à la survie de la bactérie dans l'hôte risque d'inactiver ce même gène et d'entraîner la mort du microorganisme. Puisque les bactéries mutantes avaient été conservées et identifiées avant l'infection, il est alors possible de retracer les mutants porteurs d'un gène important. Ce genre de sélection est désignée sélection négative. Les bactéries d'intérêt seront finalement étudiées plus en profondeur, c'est-à-dire que les gènes inactivés qui sont potentiellement des facteurs de virulence (sans lesquels App ne peut survivre dans l'hôte) seront sous-clonés puis séquencés.

niveau d'expression de la transposase. Des études ont d'ailleurs prouvé que, lorsque la transposase n'est pas induite par l'IPTG, aucun mutant n'est obtenu lors des mutagenèses (46).

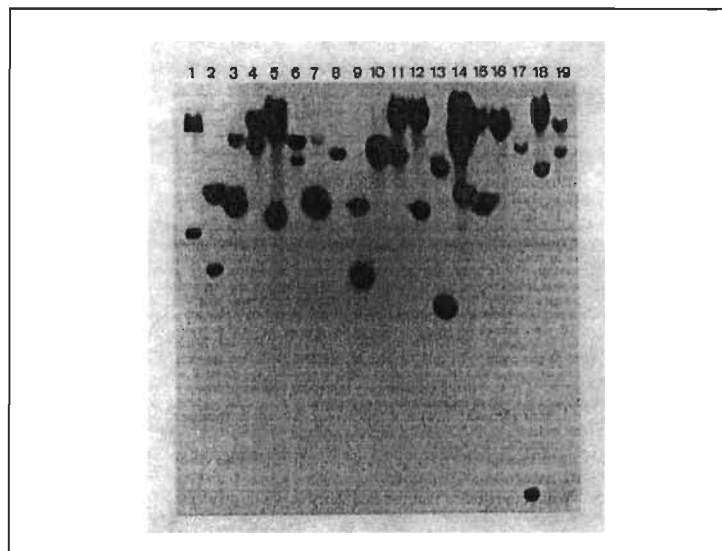


Figure 5. Résultat d'un Southern blot présentant des patrons d'hybridation différents, qui permettent de confirmer une insertion aléatoire de chacun des transposons (référence : Tascon *et al*, Journal of Bacteriology, 1993).

6.3 Le criblage

L'étape finale du STM consiste à infecter des souris à partir des mutants construits précédemment. Chaque souris est infectée avec une banque de mutants dont le nombre varie selon le nombre de "tags" différents disponibles. Après 18 heures d'infection, les bactéries survivantes sont récupérées par resuspension dans un milieu de culture liquide et identifiées par PCR. Les bactéries qui nous intéressent sont cependant celles qui n'ont

résistance à la kanamycine (voir le complément de “Matériel et méthodes”) et pUC18 *NotI* (figure 5). Les deux derniers plasmides furent une gracieuseté de V. De Lorenzo. (9).

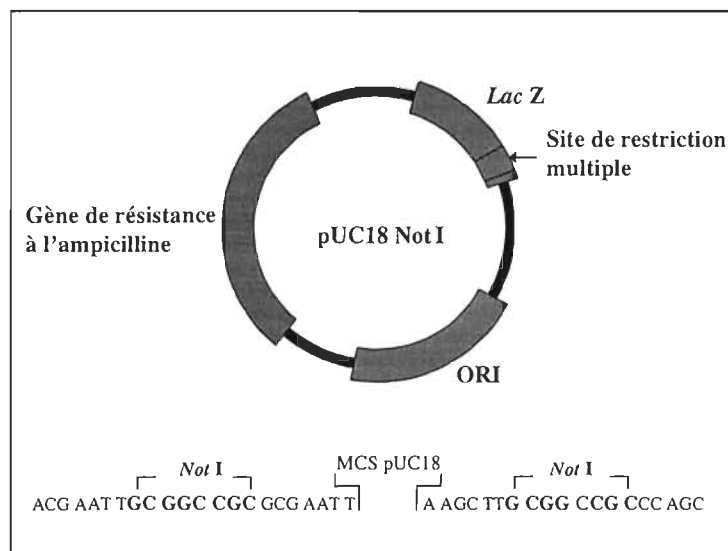


Figure 6. Représentation schématique du vecteur pUC18 *NotI* employé pour le clonage des “tags”. ORI: origine de réplication; MCS: “multiple cloning site”.

La liste des “tags” qui ont été synthétisés pour STM apparaît dans le tableau 1. Chacun d’entre eux a été conçu de la même façon. Les nucléotides 1 à 13 et 21 sont toujours conservés et les nucléotides 14 à 20 sont variables, ce qui confère la spécificité à chacun des tags. Aussi, tous les “tags” possèdent une T_m similaire située à environ 64°C de façon à faciliter les réactions d’amplification par PCR. L’appariement des “tags” a été réalisé dans un tampon spécialement prévu à cet effet et dont la composition a été ajustée selon un protocole de Life Technologies.

Séquence nucléotidique	
1	5'-GTACCGCGCTTAAACG TTCAG-3'
2	5'-GTACCGCGCTTAAATAG CCTG-3'
3	5'-GTACCGCGCTTAAAAGTCTCG-3'
4	5'-GTACCGCGCTTAATAACGTGG-3'
5	5'-GTACCGCGCTTAAACTGGTAG-3'
6	5'-GTACCGCGCTTAAGCATGTTG-3'
7	5'-GTACCGCGCTTAATGTAACCG-3'
8	5'-GTACCGCGCTTAAAATCTCGG-3'
9	5'-GTACCGCGCTTAATAGGCAAG-3'
10	5'-GTACCGCGCTTAACAATCGTG-3'
11	5'-GTACCGCGCTTAATCAAGACG-3'
12	5'-GTACCGCGCTTAAGTAGTAGG-3'
13	5'-GTACCGCGCTTAACAGCTTAG-3'
14	5'-GTACCGCGCTTAACACTGATG-3'
15	5'-GTACCGCGCTTAAGCACTATG-3'
16	5'-GTACCGCGCTTAATGCACATG-3'

Tableau 1. Séquences d'ADN des oligonucléotides synthétisés pour STM.

Les deux oligonucléotides qui composent chacun des “tags” ont été mélangés avec le tampon d'appariement et de l'eau déionisée stérile puis ont été incubés pendant 10 minutes dans un bloc chauffant à 65°C. Cette étape avait pour but de séparer chacun des

oligonucléotides afin qu'ils puissent ensuite s'hybrider de façon plus spécifique. Suite au chauffage, les échantillons ont été retirés du bloc afin de leur permettre de gagner graduellement la température de la pièce et de s'hybrider de façon complémentaire.

Les "tags" nouvellement assemblés ont ensuite été insérés individuellement par ligation à l'intérieur du plasmide pUC18 *NotI*. Pour ce faire, pUC18 *NotI* a d'abord été digéré avec l'enzyme de restriction *KpnI* (NEB) et les extrémités protubérantes ainsi générées ont été pollies à l'aide de l'enzyme T4 DNA polymérase (NEB) selon les recommandations du manufacturier. Les extrémités à bouts francs du vecteur devenaient donc compatibles avec celles des "tags". Chacun d'entre eux a ensuite été introduit dans le site *KpnI* polli du vecteur en utilisant 200 U de l'enzyme T4 DNA ligase (NEB) durant une incubation à 16°C qui s'étendait sur 16 à 24 heures. Lors de cette étape de clonage, aucun traitement à la phosphatase alcaline n'a été requis, les "tags" étant préalablement déphosphorylés. L'ADN résultant de la ligation a été électroporé dans la souche *E. coli* DH5 α et les cellules bactériennes recombinantes ont été sélectionnées sur un milieu TSA contenant de l'ampicilline, du X-Gal et de l'IPTG. Les bactéries ayant incorporé le vecteur ont donc poussé, ayant acquis la résistance à l'ampicilline conférée par le plasmide, et les clones renfermant un "tag" apparaissaient en blanc, le gène de la β -galactosidase ayant été inactivé par l'insertion de ce dernier. L'ADN plasmidique des cellules transformées a été préparé par mini-prep selon les spécifications du manufacturier (Roche) et a ensuite été digéré par l'enzyme *NotI* puis déposé sur gel afin de s'assurer que l'insert était bien présent. Les vecteurs ayant incorporé le "tag" ont encore une fois été digérés avec l'enzyme *NotI* et les produits de digestion ont été déposés sur un gel d'agarose 2%.

Chacune des cassettes *NotI* contenant un “tag” a alors été extraite du gel en utilisant la trousse “QIAquick gel extraction kit” de Qiagen. Le vecteur pLOFΔ*NotI* a été digéré par l’enzyme *NotI*, afin de recevoir les cassettes *NotI* contenant chacun des “tags” (figure 6), puis a été déphosphorylé à l’aide de l’enzyme SAP (“shrimp alkaline phosphatase”; Roche). Cette étape de déphosphorylation avait pour but de retirer le phosphate présent à l’extrémité 5’ du vecteur et ainsi de rendre possible la liaison entre la cassette et le plasmide. Les ligations entre pLOFΔ*NotI* et les cassettes ont été réalisées dans les conditions qui ont été mentionnées précédemment.

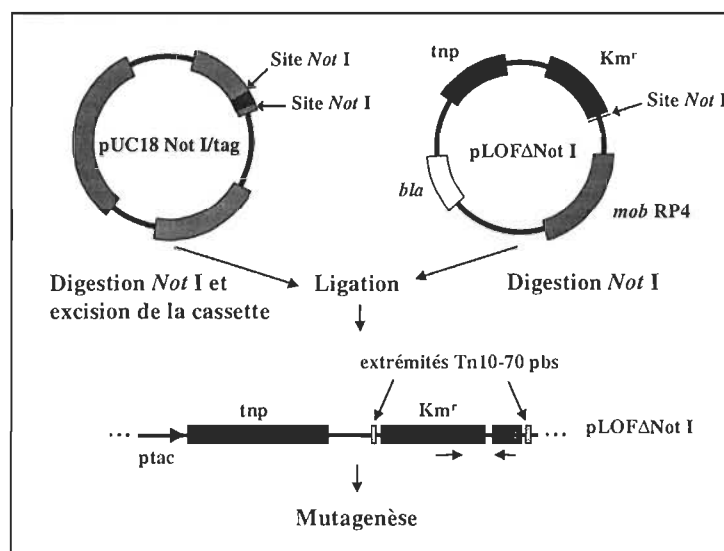


Figure 7. Représentation de l’étape de clonage de la cassette *NotI* à l’intérieur du vecteur pLOFΔ*NotI*. Ptac : promoteur du gène *tnp*; *tnp* : gène de la transposase; *bla* : gène de résistance à l’ampicilline; *km^r* : gène de résistance à la kanamycine; *mob RP4* : gène de mobilisation.

L’ADN résultant de cette ligation a été électroporé dans *E. coli* DH5α *λpir* et les bactéries ont été étalées sur un milieu TSA additionné de kanamycine et d’ampicilline.

Une double sélection s'imposait lors de cette étape puisque le vecteur contenait les gènes de résistance pour ces deux antibiotiques. Les plasmides ayant intégré les "tags" correctement ont finalement été détectés par PCR en utilisant des conditions qui seront décrites ultérieurement.

Les procédures de mutagenèse utilisées pour App 4074 Nal^r ont été adaptées d'un protocole mis au point par Tascon et al. (46). Les plasmides contenant le transposon ont été mobilisés de la souche *E. coli* S17-1 λpir à App 4074 Nal^r par conjugaison en utilisant une technique dans laquelle les bactéries entrent en contact sur une membrane poreuse. Les deux souches ont d'abord été cultivées toute la nuit sur des milieux de culture BHI contenant les réactifs et les antibiotiques appropriés; soit 50 $\mu\text{g/mL}$ d'acide nalidixique et 50 $\mu\text{g/mL}$ de $\beta\text{-NAD}$ pour App 4074 Nal^r et 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamycine pour *E. coli* S17-1 λpir . Chacune des cultures a ensuite été mélangée dans 5 mL de solution physiologique stérile (0,85% NaCl) afin d'obtenir un mélange homogène d'une densité optique (à 650 nm) égale à 0,8. 500 μL des solutions du donneur et du receveur ont été mélangées ensemble dans 5 mL d'une solution de MgSO_4 10 mM stérile puis le tout a été filtré sur une membrane Millipore de 0,45 μm de type HA. Les filtres sur lesquels les bactéries donneuses et receveuses se retrouvaient ont été placés sur un milieu solide BHI contenant 100 $\mu\text{g/mL}$ de NAD. Suite à une incubation de huit heures à 37°C, les membranes ont été transférées sur des milieux BHI contenant 100 μM d'IPTG et 100 $\mu\text{g/mL}$ de NAD pour une incubation à 37°C qui s'étendait sur toute la nuit. Les cellules bactériennes ont finalement été resuspendues dans 4 mL de solution physiologique stérile et les dilutions appropriées ont été étalées sur un milieu solide de sélection BHI contenant

100 µg/mL de NAD, 50 µg/mL de kanamycine et 50 µg/mL d'acide nalidixique. Les colonies résistantes à la kanamycine et à l'acide nalidixique ont été repiquées dans des microplaques de 96 puits contenant du bouillon BHI additionné de 100 µg/mL de NAD et de 25 µg/mL d'acide nalidixique. Pour l'entreposage, du DMSO a été ajouté à chaque puits à une concentration finale de 7% et les mutants ont été congelés à -80°C.

Au total, 21 groupes contenant 12 mutants différents ont été testés dans les souris. Afin d'éviter d'avoir des fluctuations de croissance, chacun des mutants d'un même groupe a été cultivé individuellement dans un bouillon BHI contenant un supplément d'Isovitalex (BBL) (concentration finale de 1%), pendant 18 heures à 37°C. Des aliquots de ces cultures ont ensuite été rassemblés dans un tube (un tube différent pour chacun des groupes) et 25 µL de ce mélange, qui contenait environ un million de bactéries par µL, a été ajouté à 275 µL de PBS 1X stérile pour l'infection des souris. Un échantillon de chacun des groupes était conservé pour effectuer des comptes bactériens, des mesures de densité optique et des analyses par PCR. Les analyses par PCR étaient menées sur tous les échantillons afin de s'assurer que le groupe de mutants *in vitro* (groupe de mutants servant à l'inoculation des souris) était complet et qu'aucun mutant testé ne manquait au mélange-inoculum. Les mesures mentionnées précédemment étaient nécessaires pour s'assurer qu'aucun mutant n'était atténué avant même l'inoculation des souris. Si c'était le cas, le mutant en question était retiré du groupe et éliminé afin de ne pas fausser les résultats en fournissant des faux négatifs.

Des souris mâles de type CD-1 ont été utilisées pour le criblage. Chacune d'elles pesait approximativement 25 à 30 grammes et était âgée de six semaines (Charles-River Canada). Les souris étaient inoculées une heure après la fin de la culture des mutants. Elles étaient alors injectées de façon intrapéritonéale avec les 300 μL du mélange qui avait été préparé préalablement. Les souris étaient sacrifiées 18 heures après l'administration du mélange de mutants. Les poumons et la rate de chacune d'entre elles étaient ensuite prélevés puis incubés pendant 90 minutes à 37°C dans un mL de bouillon BHI contenant 1% d'Isovitalex. Suite à une agitation vigoureuse, 200 μL du bouillon contenant les bactéries provenant des organes prélevés précédemment a été étalé sur des milieux solides BHI préparés avec 100 $\mu\text{g/mL}$ de NAD et 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamycine. Ces cultures ont ensuite été incubées toute la nuit à 37°C. Afin de récupérer les mutants survivants, cinq mL de TE PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 0,1 mM) a été ajouté à la surface des pétris renfermant ces derniers et le tout a été homogénéisé à l'aide d'une tige de verre. Un aliquot de chacune des homogénéisations a ensuite été soumis à une épreuve de PCR. Tout d'abord, les aliquots étaient incubés dans un bain d'eau bouillante pendant 10 minutes. Cette étape avait pour but de faire éclater les bactéries et de permettre la libération de leur contenu d'ADN. Les échantillons ayant subi ce traitement ont ensuite été centrifugés afin de séparer l'ADN bactérien des protéines et des débris cellulaires. Chacune des amplifications a été accomplie en utilisant des volumes de réaction de 50 μL qui renfermaient les réactifs suivants : 3 μL d'ADN bactérien bouilli, 0,5 μL de DMSO, 5 μL de tampon 10X "*Taq* DNA polymerase reaction buffer" (Qiagen), 200 μM de chaque dNTP, un μL de chacune des amorces (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; tag et pLOF KanR1) et 1,25 U d'enzyme "*Hot start Taq* DNA polymerase" (Qiagen). Les

amplifications par PCR ont été effectuées selon les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes était suivie de 30 cycles d'amplification qui comportaient une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une étape d'appariement de 30 secondes à 65°C et une étape de polymérisation à 72°C de 30 secondes. Les produits résultant des amplifications ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose 2% et celui-ci a été photographié suite à une migration de 60 minutes à 80 Volts.

Les mutants à virulence atténuée ont été récupérés à partir des microplaques de 96 puits et ont été cultivés individuellement sur des milieux BHI contenant 100 µg/mL de NAD et 50 µg/mL de kanamycine. Rappelons que les mutants sont résistants à la kanamycine puisqu'ils possèdent le gène de résistance à cet antibiotique à l'intérieur du transposon inséré dans leur génome. Pour chaque mutant identifié, une préparation d'ADN génomique a été effectuée en utilisant la trousse "AquaPure Genomic DNA Isolation kit" (BioRad). Les préparations ont ensuite été digérées avec l'enzyme *Bgl*II (Roche) pendant trois heures à 37°C. L'ADN digéré a ensuite été déposé sur un gel d'agarose 1% et les bandes incluses entre 1,5 et 10 kpb ont été extraites en utilisant la trousse "QIAquick gel extraction kit" (Qiagen). Le vecteur pUC18 *Not*I a été utilisé pour le clonage des régions flanquantes du transposon. Il a d'abord été digéré par l'enzyme de restriction *Bam*HI (Roche), qui génère des extrémités compatibles avec celles de *Bgl*II, et a été déphosphorylé en utilisant la SAP, selon les recommandations du manufacturier. Les ligations visant à insérer les fragments d'ADN génomique dans le vecteur pUC18 *Not*I ont été réalisées à 16°C en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase, avec une incubation qui

durait de 16 à 24 heures. L'ADN résultant de cette opération a été électroporé dans *E. coli* DH5 α et les bactéries ont ensuite été étalées sur un milieu TSA contenant 100 $\mu\text{g/mL}$ d'ampicilline et 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamycine, le transposon contenant le gène de résistance à ce dernier antibiotique. Le succès de la ligation a pu être vérifié en effectuant des digestions enzymatiques sur les mini-preps correspondant aux clones recherchés, permettant ainsi de déterminer la longueur des inserts, et la présence du transposon a été confirmée par PCR.

Bien que les réactions de séquençage des régions flanquantes du transposon n'aient pas encore été effectuées, la marche à suivre pour cette dernière étape du projet a déjà été déterminée. Les séquences seront analysées à partir des mini-preps renfermant les fragments d'ADN mutés par le transposon. Les réactions seront réalisées par la méthode "dideoxy T7 polymerase chain termination" en utilisant le "ABI PRISM_{tm} DYE TERMINATOR Cycle Sequencing", avec l'enzyme Amplitaq DNA polymerase FS (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA). Deux amorces internes sont disponibles pour le séquençage : pLOF KanF1 (5'-GACCGATACCAGGATCTTGCC-3') et pLOF KanR1 (5'-GCGGCCTCGAGCAAGACGTTT-3'). Elles possèdent des sites d'hybridation situés dans le gène de résistance à la kanamycine, et permettent une lecture qui débute de l'intérieur du gène inactivé, vers ses extrémités. Les amorces utilisées pour les amplifications par PCR et les réactions de séquençage proviennent de chez Sigma Genosys. Finalement, les analyses de séquences (comparaisons et homologies) seront effectuées en utilisant les programmes du "Genetics Computer Group (GCG)" de l'Université du Wisconsin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES (COMPLÉMENT)

Cette section est un complément de la section “Matériel et méthodes”. Elle traite plus particulièrement de la construction du vecteur pLOFΔNotI et de la façon dont nous avons procédé pour y insérer les “tags”. Lors de cette étape, plusieurs obstacles ont été rencontrés et plusieurs stratégies et alternatives ont donc dû être envisagées.

La stratégie initiale pour insérer les “tags” à l’intérieur du vecteur pLOF/Km mini-tn10 se voulait fort simple. Comme il existait un seul site de restriction unique dans le plasmide, soit le site *Sfi*I, l’option la plus logique était de cloner chacun des “tags” dans ce site. Pour ce faire, le vecteur pLOF/Km mini-tn10 a été digéré par l’enzyme de restriction *Sfi*I, puis les “tags” ont été incorporés séparément dans le plasmide à l’aide de l’enzyme T4 DNA ligase (NEB) selon les recommandations du manufacturier. Malheureusement, pour des raisons inconnues, l’enzyme de restriction utilisé a généré des patrons de restriction variables et présentaient une activité non-spécifique, et aucun clone possédant un “tag” n’a été obtenu. Cependant, précisons que les extrémités générées par l’enzyme *Sfi*I n’étaient pas compatibles avec celles des “tags” et que le processus de polissage requis pour produire des extrémités à bouts francs réduit considérablement le taux de succès des ligations. D’autres stratégies ont donc dû être envisagées afin d’obtenir un vecteur de type pLOF/Km mini-tn10 contenant un “tag” situé à proximité du transposon. Aucun autre vecteur n’était disponible puisque seul pLOF/Km mini-tn10 fournissait les résultats escomptés lors des mutagenèses qui servaient à créer les bactéries mutantes.

La deuxième approche permettant de cloner les “tags” dans le vecteur pLOF/Km mini-tn10 nécessitait un outil supplémentaire. Cet outil était le plasmide pUC18 *Sfi*I. Ce vecteur est identique au plasmide pUC18 à l’exception que le site de clonage multiple est flanqué de part et d’autre par des sites de restriction *Sfi*I. Le site de clonage multiple de pUC18 *Sfi*I contient plusieurs sites de coupure dont certains permettent d’obtenir des extrémités à bouts francs compatibles avec celles des “tags”. C’est notamment le cas du site *Hinc*II, qui fut choisi pour le clonage des “tags” dans pUC18 *Sfi*I. L’efficacité du clonage est facilement vérifiable puisque celui-ci a lieu dans le gène *lacZ* qui produit une coloration bleue lorsque le milieu de culture contenant les bactéries transformées comprend les substrats appropriés, soient du X-Gal et de l’IPTG. Donc, si le “tag” s’insère dans le site *Hinc*II, il interrompt le gène *lacZ* et empêche la production de la protéine β -galactosidase qui confère la coloration bleue à la bactérie transformée. Par conséquent, les colonies renfermant les clones qui ont inséré un “tag” apparaissent avec une coloration blanchâtre. En ce qui nous concerne, le clonage des “tags” à l’intérieur du vecteur pUC18 *Sfi*I a été réalisé avec succès, mais l’étape suivante n’a pas fourni les résultats escomptés. Lorsque les “tags” sont introduits dans pUC18 *Sfi*I, la cassette *Sfi*I les contenant doit à son tour être excisée par l’enzyme de restriction correspondant et être insérée dans le site *Sfi*I de pLOF/Km mini-tn10. Encore une fois, cette tentative de clonage dans le site *Sfi*I de pLOF/Km mini-tn10 s’est avérée infructueuse.

Puisque le seul site unique de pLOF/Km mini-tn10 faisait maintenant défaut de façon évidente, une autre stratégie nécessitant l’utilisation d’un autre site de restriction a dû être adoptée pour le clonage. Sachant que la séquence du site *Avr*II était incluse dans celle du

site *Sfi*I, une autre possibilité a donc pu être envisagée. L'obstacle majeur de cette approche résidait dans le fait que le site de restriction *Avr*II coupait à deux endroits à l'intérieur du vecteur pLOF/Km mini-tn10, soit dans la site *Sfi*I et ailleurs. Sachant que la coupure du plasmide par *Avr*II au niveau du site *Sfi*I inactivait ce dernier, il était alors possible d'éliminer les plasmides coupés au mauvais endroit par *Avr*II en procédant d'abord par digestion partielle. pLOF/Km mini-tn10 a donc subi une digestion enzymatique partielle d'une durée variant de 5 à 10 minutes par l'enzyme de restriction *Avr*II. Le résultat de cette opération a ensuite été déposé sur un gel d'agarose 1%. Trois bandes d'ADN apparaissaient sur le gel suite à la coloration de celui-ci. La bande la plus grande représentait le vecteur pLOF/Km mini-tn10 sous sa forme linéarisée, digéré une fois à l'un ou l'autre des sites *Avr*II alors que les deux autres bandes, plus petites, correspondaient au même vecteur coupé au niveau des deux sites *Avr*II. Pour poursuivre, la forme linéarisée du vecteur a été extraite du gel (QIAquick gel extraction kit) puis digérée par l'enzyme de restriction *Sfi*I. Le fragment résultant a à son tour été déposé sur un gel d'agarose 1%. À nouveau, la coloration du gel révélait la présence de trois bandes. Les deux bandes du bas, plus petites, représentaient le vecteur en question coupé par l'enzyme *Sfi*I. La bande la plus grande était cependant celle qui devait fournir le résultat attendu. Encore une fois, elle représentait le plasmide pLOF/Km mini-tn10 sous sa forme linéarisée. Elle n'avait donc pas subi de coupure par *Sfi*I puisque la digestion préalable par l'enzyme *Avr*II avait inactivé le site *Sfi*I en coupant à l'intérieur de celui-ci. En procédant ainsi, il était possible d'obtenir un plasmide pLOF/Km mini-tn10 digéré une fois, en amont du gène de résistance à la kanamycine, par un enzyme différent de *Sfi*I. Bien que cette stratégie permettait d'obtenir un vecteur possédant un site unique de

coupure situé dans le transposon, utile pour le clonage des “tags”, elle a vite été abandonnée en raison du faible rendement de plasmide obtenu à la toute fin du procédé. Comme le plasmide était ouvert, il n’était pas possible de le faire multiplier à l’intérieur d’une souche bactérienne puis de le récupérer par mini-prep ou midi-prep. Seules de très faibles quantités demeuraient donc disponibles pour les étapes suivantes de clonage.

Pour la quatrième tentative de clonage des “tags”, une autre approche a dû être utilisée. Comme le site de clonage *Sfi*I était devenu inutilisable, un autre site situé en amont du gène de résistance à la kanamycine du transposon devait être obtenu. À cet endroit, deux autres sites de restriction étaient déjà présents, soient les sites *Mlu*I et *Not*I. Cependant, ces sites ne pouvaient pas servir de sites de clonage étant donné qu’ils ne possédaient pas la caractéristique d’être des sites uniques. Pour chacun des sites, il existait un autre site qui pouvait être clivé par l’enzyme correspondant à celui-ci. Ces sites supplémentaires étaient situés à l’autre extrémité du transposon, en aval du gène de résistance à la kanamycine, près des répétitions inversées de 70 pbs. Afin de pouvoir insérer les “tags” dans l’un ou l’autre des sites situés en amont du gène de résistance à la kanamycine, l’autre site correspondant devait donc être inactivé d’une façon quelconque. Le site choisi a été *Not*I puisqu’il avait déjà fourni de bons résultats lors d’expériences de clonage antérieures. Cette alternative comportait cependant un obstacle important: étant donné que le site à inactiver était situé tout près d’une des répétitions inversées, l’inactivation du site en question risquait d’endommager cette dernière. Sachant que les répétitions inversées sont essentielles au bon déroulement de la mutagenèse, l’intégralité de celles-ci doit donc être assurée.

Pour inactiver le site *NotI* indésirable, c'est-à-dire celui qui est situé en aval du gène de résistance à la kanamycine, la digestion enzymatique partielle a encore une fois été utilisée comme approche. Le vecteur pLOF/Km mini-tn10 a donc subi une digestion enzymatique partielle d'une durée variant de 5 à 10 minutes par l'enzyme de restriction *NotI*. Les fragments d'ADN résultants ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose 1% et comme l'enzyme coupait à deux endroits, trois bandes ont été observées suite à la coloration du gel. Les deux bandes les plus petites correspondaient au plasmide digéré au niveau des deux sites *NotI* alors que la troisième, plus grande, représentait le vecteur sous sa forme linéarisée, coupé à l'un ou l'autre des sites *NotI*. Il était aussi possible d'apercevoir deux autres bandes, plus hautes et plus pâles, qui représentaient le vecteur non-digéré sous ses formes enroulées et superenroulées. La bande correspondant au vecteur linéaire a ensuite été extraite du gel (QIAquick gel extraction kit) puis a de nouveau été soumise à une digestion enzymatique, complète cette fois. L'enzyme choisi pour cette seconde digestion a été *EcoRI* puisqu'il coupe à deux endroits dans le vecteur et qu'il permet ainsi de déterminer, par cartographie de restriction, lequel des sites *NotI* a été digéré préalablement. Le site de restriction *EcoRI* coupe le vecteur en deux parties presque égales de 5 kpb. Le site de clonage visé est donc situé à 1 kpb et 4 kpb des sites *EcoRI* alors que le site à inactiver se trouve environ à mi-chemin entre les sites *EcoRI*, soit à approximativement 2,5 kpb de ceux-ci. Suite à la digestion par *EcoRI*, deux patrons de digestion ont été observés. Dans les deux cas, trois bandes étaient présentes après la coloration du gel. Lorsque la digestion avait lieu au niveau du site potentiel de clonage, il était possible d'observer une bande à 5 kpb, une à 4 kpb et une autre à 1 kpb, alors que la

digestion au niveau du site à inactiver permettait l'observation d'une bande de 5 kpb et de deux autres bandes presque superposées d'environ 2,5 kpb. Puisque l'objectif de cette opération était d'inactiver le site de restriction *NotI* situé en aval du gène de résistance à la kanamycine, les plasmides ayant subi une digestion au niveau du potentiel site de clonage ont été mis de côté alors que les autres ont été conservés afin d'y effectuer des manipulations supplémentaires.

La stratégie la plus simple pour inactiver le site *NotI* indésirable était de remplir les extrémités cohésives générées par l'enzyme correspondant lors de la coupure puis de refermer le plasmide sur lui-même afin que le site en question ne soit éventuellement plus reconnu par l'enzyme *NotI*. Le remplissage a d'abord été effectué à l'aide de l'enzyme Klenow (NEB). À une digestion standard de 20 µL, 1,5 µL de dNTPs 0,5 mM (Roche), 2,4 µL de tampon Ecopol (NEB) et 0,5 µL d'enzyme Klenow (NEB) ont été ajoutés afin d'obtenir des conditions optimales. Le tout a été incubé 15 minutes à 25°C puis 10 minutes à 75°C dans le but d'inactiver l'enzyme. La ligation qui a suivi a quant à elle été réalisée à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase (NEB) selon les recommandations du manufacturier. Elle avait pour but de refermer le vecteur et, par la même occasion, de faire disparaître le site *NotI* qui était présent à cet emplacement. Les vecteurs résultants ont finalement été transformés dans la souche *E. coli* S17-1 λ pir par électroporation puis vérifiés par digestion enzymatique. Le nouveau vecteur ainsi créé possédait les mêmes caractéristiques que pLOF/Km mini-tn10, un site de clonage supplémentaire et les mêmes capacités de mutagenèse. Il fut baptisé pLOFΔ*NotI*.

Dès les premières manipulations du nouveau vecteur, les résultats se sont avérés positifs. Plusieurs stratégies de clonage à l'intérieur du site *NotI* ont été tentées. Lors des amplifications par PCR, les "tags" devaient fournir des résultats d'une grande spécificité afin qu'il n'y ait pas de confusion lors de l'interprétation de ces derniers. Comme le site d'insertion des "tags" semblait influencer la spécificité des amplifications par PCR, des essais de clonage ont été accomplis directement dans le site *NotI* de pLOFΔ*NotI* puis dans d'autres sites du vecteur pUC18 *NotI*. Comme pUC18 *SfiI*, pUC18 *NotI* est identique à pUC18 à l'exception que des sites de restriction *NotI* sont flanqués de chaque côté du site de clonage multiple. Suite à l'insertion des "tags" dans l'un ou l'autre des sites uniques du site de clonage multiple, la cassette *NotI* peut être extraite puis introduite dans le site *NotI* de pLOFΔ*NotI*. Les "tags" 1 à 12 ont tout d'abord été insérés un à un à l'intérieur du site *NotI* du vecteur pLOFΔ*NotI*. Pour ce faire, le plasmide receveur, pLOFΔ*NotI*, a été digéré par l'enzyme de restriction *NotI* puis les extrémités produites lors de la coupure ont été remplies afin de former des bouts francs, compatibles avec ceux des "tags". L'enzyme Klenow a encore une fois été utilisé pour le remplissage. Les ligations entre le vecteur digéré et les "tags" appariés ont donc eu lieu dans un volume de 15 µL, à 16°C durant toute la nuit et l'enzyme utilisé fut la T4 DNA ligase.

Les "tags" ont aussi été clonés dans pLOFΔ*NotI* à partir de la cassette *NotI* du vecteur pUC18 *NotI*. Dans ce cas, deux sites d'insertion ont été utilisés, soient *EcoRI* et *KpnI*. En ce qui concerne les manipulations réalisées avec le site *EcoRI*, les "tags" 1 à 12 ont été clonés tandis que les "tags" 1 à 16 ont subi le même sort avec le site *KpnI*. Les protocoles de clonage se sont avérés pratiquement identiques dans les deux cas, sauf pour

l'étape qui consiste à rendre les extrémités des vecteurs compatibles avec celles des "tags". Effectivement, le site *EcoRI* génère des extrémités 5' protubérantes alors que *KpnI* génère des extrémités 3' protubérantes. Le procédé qui permet d'obtenir des bouts francs est donc inversé selon la situation et requiert des enzymes différents. Dans le cas d'extrémités 5' protubérantes créées par un site et un enzyme comme *EcoRI*, on parle de remplissage, alors que des extrémités 3' protubérantes, comme c'est le cas pour *KpnI*, impliquent plutôt un polissage. L'enzyme utilisé pour le remplissage demeure le même, soit l'enzyme Klenow, tandis que le polissage est effectué par l'enzyme T4 DNA polymérase. Pour le clonage des "tags", le vecteur pUC18 *NotI* a d'abord été digéré par l'enzyme *EcoRI* ou *KpnI* selon le site d'insertion choisi. Suite à l'étape de remplissage ou de polissage, les "tags" ont ensuite été introduits un à un dans le vecteur. La cassette *NotI* a finalement été extraite de pUC18 *NotI* en digérant avec l'enzyme *NotI* puis elle a été incorporée à l'intérieur du site *NotI* de pLOFΔ*NotI*. Lors de cette dernière manipulation, aucune étape de remplissage n'était requise puisque les extrémités de la cassette et du vecteur étaient déjà compatibles, ayant été digérés par le même enzyme.

Lorsque la construction des vecteurs contenant les "tags" s'est enfin achevée, les tests de spécificité ont pu être entrepris de façon sérieuse. Pour s'assurer d'obtenir des résultats clairs et sans équivoque lors des éventuelles manipulations avec les souris, chacun des "tags" doit fournir un signal intense et très spécifique lors des amplifications par PCR. Les conditions de départ utilisées lors des étapes de PCR n'étaient pas au point et les résultats obtenus n'offraient donc que très peu de spécificité. En ce qui concerne les réactifs, les tubes contenaient 1 µL de chacune des amorces, 1 µL de dNTPs, 1,25 U de

l'enzyme taq polymérase (Roche) et 10 μ L de la cible à amplifier. Les conditions d'amplification étaient les suivantes: un "hot start" était d'abord effectué à 95°C pendant 15 minutes et 30 cycles d'amplification suivaient. Lors de chacun, une dénaturation de 30 secondes à 94°C avait lieu, suivie d'un appariement de 30 secondes à 65°C et d'une polymérisation de 30 secondes à 72°C. Des ajustements ont donc dû être envisagés, autant au niveau des réactifs que des conditions, afin de parvenir à un niveau de spécificité supérieur. Sachant que la quantité d'amorces et d'enzyme est inversement proportionnelle à la stringence de la réaction, des essais ont été tentés avec des quantités d'amorces et d'enzyme inférieures à la norme. La stratégie a fonctionné en ce qui concerne la spécificité des signaux, cependant les amplicons présentaient désormais une intensité très faible, ce qui ne faisait que déplacer le problème. Des essais ont ensuite été entrepris avec un nouvel enzyme : la hot start taq polymérase (Qiagen). Celui-ci devait avoir la particularité d'offrir une spécificité accrue par rapport aux autres enzymes. C'est d'ailleurs ce qui fut observé dès les premières tentatives d'amplification. La spécificité, bien qu'elle était plus grande, n'était toutefois pas parfaite et d'autres améliorations devaient être apportées dans le but de l'accroître davantage. De nouveaux essais ont alors été tentés, cette fois en variant la température d'appariement lors de la réaction d'amplification. En augmentant la température d'appariement graduellement jusqu'à 72°C, une augmentation de la stringence a pu être observée et des amplifications de plus en plus spécifiques ont été obtenues. Il est cependant à noter que l'augmentation de la stringence a encore une fois été accompagnée d'une diminution de l'intensité des amplicons.

Les différents sites d'insertion choisis pour le clonage des "tags" ont aussi influencé la spécificité des amplifications par PCR. Des trois sites utilisés, ce sont les "tags" clonés à l'intérieur de *KpnI* qui se sont avérés être les plus spécifiques. Le phénomène qui est à l'origine de ces résultats demeure difficilement explicable. Finalement, le DMSO, ajouté à une concentration finale de 1% et utilisé à une température d'appariement de 65°C a augmenté considérablement la spécificité des amplifications tout en conservant leur intensité. Les réactifs utilisés pour obtenir des conditions gagnantes lors des réactions d'amplification ont donc été les suivants : 5 µL de tampon 10X (Qiagen), 1 µL de dNTPs (Roche), 1 µL de chacune des amorces, 1% de DMSO (soit 0,5 µL), 10 µL de la cible à amplifier et 1,25 U de hot start taq polymérase (Qiagen). Les conditions de température sont demeurées inchangées puisqu'elle permettait finalement l'obtention de résultats optimaux. Lors des manipulations avec les souris, les "tags" clonés dans le site *KpnI* ont été utilisés pour mener le projet à terme. Les "tags" 8 et 12 ont cependant été mis de côté étant donné qu'ils présentaient des problèmes de spécificité alors que les "tags" 4 et 9 ont été abandonnés en raison de difficultés rencontrées lors des mutagenèses. Au total, 12 "tags" ont donc été utilisés au cours des manipulations réalisées dans le cadre du projet STM, soient les "tags" 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15 et 16.

RÉSULTATS

Au total, 16 “tags” ont été synthétisés afin de mener STM à terme, mais seuls les 12 “tags” ayant fourni les meilleurs résultats de mutagenèse et de spécificité lors des PCRs ont été utilisés. Chaque “tag” a été conçu de façon à obtenir des amplifications spécifiques et présentait une T_m similaire aux autres (64°C) afin de pouvoir utiliser des conditions communes lors des réactions PCR. À l’exception des “tags” 8 et 12, tous les “tags” synthétisés ont démontré une spécificité telle qu’une seule et unique amplification était produite par PCR lorsque les amorces 1 à 12 en combinaison avec l’amorce pLOF KanR1 étaient utilisées. Ces tests de spécificité ont été réalisés aussi bien sur des plasmides renfermant un transposon marqué par un “tag” que sur des mutants provenant de mutagenèses. Dans le cas du “tag” 8, une amplification non-spécifique du “tag” 3 survenait, alors que l’amorce spécifique au “tag” 12 avait une réaction croisée avec le “tag” 5. En plus des “tags” 8 et 12, les “tags” 4 et 9 ont aussi été mis de côté en raison du faible rendement qu’ils procuraient lors des expériences de mutagenèse. Non seulement le nombre de colonies transformées lors des mutagenèses effectuées avec les “tags” 4 et 9 était faible, mais les mutants obtenus semblaient de plus être en grande partie spontanés, étant donné que le “tag” qu’ils étaient supposés contenir était souvent indétectable par PCR. Afin d’atteindre le meilleur signal possible lors des amplifications par PCR, du DMSO à une concentration finale de 1% a été ajouté à chaque réaction, permettant ainsi d’utiliser une température d’appariement plus basse tout en conservant un excellent niveau de spécificité.

Au total, douze banques comprenant plusieurs centaines de mutants d'App 4074 Nal^r ont été générées en réalisant douze conjugaisons différentes avec la souche de *E. coli* S17-1 λ pir, laquelle contenait un vecteur suicide sur lequel se trouvaient un transposon identifié par un des "tags" (23). Chacune des banques contenait des mutants qui portaient un "tag" d'identification unique, selon le vecteur utilisé lors de la mutagenèse. Bien que certaines analyses aient été effectuées pour vérifier le succès de la mutagenèse, telles que des PCRs, aucun test supplémentaire n'a été requis pour déterminer la spécificité des mutants envers leur "tag" respectif, cette étape ayant déjà été réalisée auparavant. Afin d'obtenir le plus grand nombre possible de gènes inactivés, il fallait s'assurer que la transposition se faisait de façon aléatoire. Deux preuves pouvaient venir confirmer ce phénomène. Tout d'abord, la mutagenèse elle-même pouvait fournir certains indices. Par exemple, lors de la sélection des mutants, il était possible d'observer des colonies de dimensions différentes. Ceci indiquait que les gènes inactivés n'avaient pas tous la même importance et qu'ils étaient probablement différents d'un mutant à l'autre.

Toutefois, le meilleur test pour vérifier l'efficacité et le succès de la mutagenèse demeure le Southern blot. Ce type d'analyse permet en fait de vérifier que les transformants obtenus résultent bel et bien de l'insertion aléatoire d'un transposon unique. Pour ce faire, des préparations d'ADN génomique de plusieurs mutants sont effectuées et sont ensuite digérées par deux enzymes de restriction. Le premier coupe le génome à une fréquence assez élevée et ne coupe pas dans le transposon (*EcoRI* par exemple) alors que le second, *Xho* I, coupe en plein milieu du transposon. La digestion est alors déposée sur un gel d'agarose pour migration et l'ADN est transféré sur une

membrane de nylon. Finalement, une sonde correspondant au transposon est marquée puis hybridée avec la membrane. Puisque le transposon est coupé en deux, la sonde devrait s'hybrider à deux endroits pour chacun des mutants. Si les patrons d'hybridation sont différents d'un mutant à l'autre, on peut donc affirmer que la transposition est aléatoire. Il est cependant à noter que l'expérience décrite précédemment n'a pas été effectuée, Tascon et son équipe ayant déjà démontré l'efficacité de la mutagenèse chez App en employant ce type de travaux (46).

Les mutants obtenus suite aux mutagenèses ont été repiqués un à un dans des plaques de 96 puits puis ont été conservés à -80°C. Pour les rondes de criblage dans les souris, des groupes de mutants portant tous un "tag" d'identification différent ont été formés et identifiés selon la localisation qu'ils occupaient dans les microplaques. Le criblage effectué lors de la technique STM permet la comparaison directe entre un groupe de mutants ayant servi à infecter un animal (groupe *in vitro*) et le même groupe de mutants, suite à l'infection de l'animal en question et à la récupération des mutants à partir des tissus de l'hôte (groupe *in vivo*) (49). Les mutants à virulence atténuée sont présents dans le groupe *in vitro*, mais absents du groupe *in vivo* (figure 8). L'identification des mutants à virulence atténuée à l'intérieur d'un groupe a été possible puisque chacun d'eux contenait un transposon qui comportait une séquence d'ADN unique de 21 pbs. Le criblage des mutants a été réalisé par PCR à partir des conditions mentionnées précédemment, en utilisant les amorces correspondant aux douzes "tags" présents dans chacun des groupes de mutants.

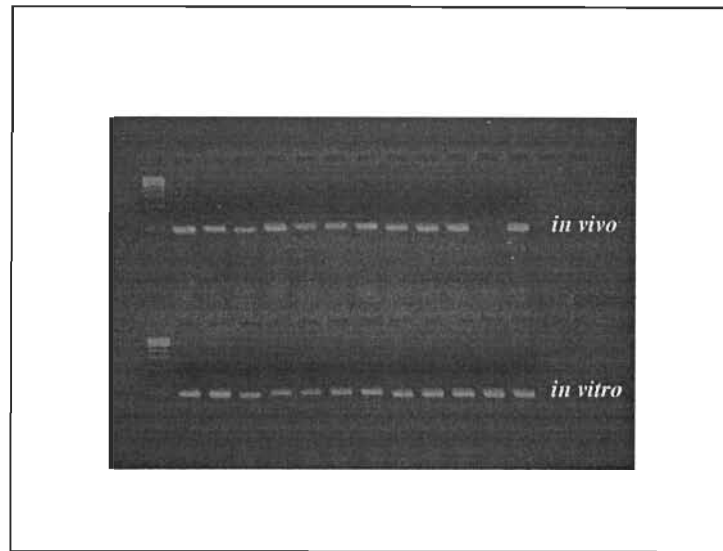


Figure 8. Gel d'ADN présentant les résultats de deux séries de PCR : groupes *in vivo* et *in vitro*. Puisque le "tag" 11 est absent du groupe de mutants récupérés suite à l'infection, la virulence du mutant correspondant à ce "tag" est considérée comme étant atténuée.

Avant les infections, chacun des mutants des groupes *in vitro* était cultivé individuellement. La défection de certains mutants était appréhendée dans le cas de cultures de groupes de bactéries. Effectivement, l'insertion du transposon dans un gène important à la réplication, mais non essentiel, pourrait atténuer la croissance d'un mutant s'il était cultivé parmi d'autres mutants sains. La compétition avec les autres mutants pour les nutriments et les molécules essentielles à la croissance désavantagerait le mutant en question. Sa réplication serait ainsi ralentie par rapport aux autres mutants, qui auraient des profils de croissance comparables avec celui de la souche sauvage. Dans ce genre de situation, les mutants défectifs *in vitro* ne seraient pas nécessairement récupérés suite aux infections de souris ou pourraient être sous-représentés. Par conséquent, pour s'assurer que tous les mutants soient également représentés dans un groupe destiné à

infecter des souris, chaque clone était cultivé séparément puis mélangé aux autres pour les infections (30).

Une banque de 254 mutants rassemblés en groupe de douze (et un groupe de quatorze) a été utilisée pour infecter des souris CD-1. En assumant une insertion aléatoire et non-spécifique des transposons mini-tn10 dans le génome de la bactérie et une longueur moyenne de un kpb pour chacun des gènes, les gènes inactivés retrouvés dans la banque représentent approximativement 10% du génome total d'App. Vingt et un groupes de mutants ont donc été criblés afin d'identifier une atténuation dans la croissance et la survie de certains mutants. Un total de 17 mutants atténués a été identifié, c'est-à-dire 6,7% des mutants criblés.

Afin de connaître l'identité du gène inactivé par le transposon, une étape de sous-clonage consistant à isoler les régions génomiques flanquantes de ce dernier a été effectuée. Les précisions concernant cette opération sont décrites dans la section "Matériel et méthodes". Cette étape avait pour but d'isoler le transposon et les régions du chromosome qui le bordent dans un vecteur. À partir d'amorces internes situées à l'intérieur du gène de résistance à la kanamycine, il est alors possible de procéder au séquençage des régions flanquantes. Bien que les étapes de sous-clonage aient été réalisées chez les 17 clones obtenus lors du criblage STM, les résultats des séquençages ne sont pas encore disponibles, les réactions étant présentement en cours. Les séquences obtenues seront entrées dans des banques de données puis comparées avec des séquences de gènes connus. Les homologies, si elles existent, nous permettront de déterminer

l'identité des gènes inactivés et de connaître les gènes essentiels à la colonisation de la bactérie dans un hôte animal. Si aucune homologie n'existe, cela signifiera qu'un nouveau gène de virulence d'importance a été découvert chez la souche à l'étude.

CONCLUSION

La fonction principale de la technique STM est de permettre la mise en évidence de gènes bactériens dont l'expression est essentielle afin d'assurer la survie du microorganisme dans un hôte animal. La méthode repose sur l'utilisation de transposons qui contiennent des séquence-oligos signatures uniques de 21 pbs qui sont désignées par le terme "tag". Le transposon permet l'inactivation aléatoire d'un gène inclus dans le génome de la souche bactérienne à l'étude alors que le "tag" permet de retracer le gène d'intérêt par PCR suite aux rondes de criblage effectuées dans les souris. Lors des infections, les souris sont inoculées avec des groupes de 12 mutants à des doses assez élevées pour reproduire la maladie chez l'animal. Si un mutant meurt et qu'il ne cause pas la maladie, nous pouvons émettre l'hypothèse que le gène inactivé par le transposon est essentiel à la survie de la bactérie dans l'hôte. Comme chaque "tag" est spécifique et qu'il existe des amorces propres à chacun, les mutants qui ne survivent pas peuvent être identifiés par PCR, par sélection négative. Les gènes essentiels à la survie des mutants dans l'hôte sont ceux qui nous intéressent et qui seront étudiés davantage.

La technique STM employée ici correspond en fait à une modification de la méthode originale créée par David Holden (23). Cette dernière méthode propose l'utilisation d'un très grand nombre de "tags" et une identification par hybridation. En ce qui nous concerne, les infections sont réalisées avec des groupes de 12 mutants et l'identification est réalisée par PCR. Il en résulte donc une plus grande spécificité puisque le petit nombre de "tags" diminue les chances d'identification croisée. Il est aussi à noter que le

PCR est en soit une technologie plus sensible que l'hybridation. Dans la méthode originale, qui a d'ailleurs déjà été expérimentée chez App (15), les "tags" ont une longueur totale de 80 pbs et possèdent une région centrale variable de 40 pbs, qui confère une identité propre à chacun (30). Les régions centrales sont synthétisées aléatoirement et peuvent inclure une possibilité de 10^{17} séquences différentes. De part et d'autre des segments variables sont situées les régions invariables. Celles-ci sont complémentaires à des amorces d'ADN qui permettent d'amplifier le segment central par PCR afin d'obtenir une sonde spécifique au "tag" (21). Suite aux mutagenèses, chaque mutant est soumis à une ronde de PCR et ce sont les amplicons alors obtenus qui serviront de sonde pour les étapes d'hybridation. Les hybridations en question ont lieu après les rondes de criblage avec les souris et permettent la mise en évidence des mutants n'ayant pas survécu lors des infections. L'identification des mutants à virulence atténuée est donc effectuée par hybridation à l'aide des sondes synthétisées précédemment par PCR, mais le principe de sélection négative qui s'applique à STM demeure exactement le même que lorsque le criblage est réalisé par PCR.

Contrairement à STM, les stratégies classiques de mutagenèse par transposition sont limitées par le fait que chacun des mutants doit être testé individuellement afin de parvenir à identifier un phénotype atténué (10). Avec STM, il est ainsi possible d'obtenir l'identification simultanée de plusieurs mutants par sélection négative (21). La méthode STM propose de nombreux autres avantages, non seulement par rapport aux techniques traditionnelles de mutagenèse, mais aussi par rapport aux autres techniques permettant l'isolement de gènes s'exprimant exclusivement *in vivo*. Une autre caractéristique

importante de STM est qu'elle permet l'identification de gènes de virulence et/ou d'autres gènes qui sont impliqués dans différentes étapes de l'infection (7). Par conséquent, peu importe le moment auquel intervient le gène au cours de l'infection, STM sera en mesure de détecter la défaillance produite en raison de l'inactivation de celui-ci. La technique fonctionne aussi bien chez les bactéries Gram-positives que chez les Gram-négatives (7). Cependant, certains vecteurs contenant des transposons ne peuvent être utilisés que chez un seul groupe (Gram+ ou Gram-). C'est notamment le cas du plasmide pLOF/Km mini-tn10 dont l'origine de réplication *ori R6K* n'est reconnue que par les bactéries Gram-négatives. Le dernier avantage majeur de STM intervient par rapport à la mutagenèse chimique. Contrairement à celle-ci, la mutagenèse par transposition provoque une interruption complète du gène touché, ce qui augmente les chances d'inactivation de ce dernier (9). De plus, avec STM, le phénotype du microorganisme ayant subi la transposition est génétiquement lié à un marqueur de sélection, comme un gène de résistance à un antibiotique et/ou un "tag".

Évidemment, la méthode STM n'est pas parfaite et comporte quelques imperfections. Les techniques qui permettent l'isolement de gènes s'exprimant exclusivement *in vivo* utilisent des animaux vivants afin de recréer le plus fidèlement possible les conditions se retrouvant à l'intérieur de l'hôte naturel de l'agent infectieux. Un des inconvénients des modèles animaux est qu'il peut y avoir une complémentation par d'autres mutants, comme c'est le cas pour les toxines et les sidérophores (31). Puisque les mutants sont en contact tout au long de l'infection, les protéines qui sont exportées à l'extérieur de la paroi cellulaire peuvent être utilisées par d'autres bactéries déficientes envers celles-ci et

ainsi dissimuler une défaillance causée par l'inactivation d'un gène essentiel. Lors de la sélection des mutants à virulence atténuée, un phénotype négatif ne veut pas nécessairement dire qu'un gène essentiel à la survie du mutant dans l'hôte a été inactivé (21). Pour des raisons variables, certains mutants peuvent croître plus difficilement que d'autres lors des infections et ainsi donner l'impression d'avoir subi l'inactivation d'un gène indispensable à leur survie. Selon la localisation du transposon dans le gène d'un opéron, la transcription peut aussi être affectée. Par exemple, si l'insertion a lieu à l'intérieur d'un promoteur, tous les gènes de l'opéron qui sont régulés par ce promoteur ne seront pas exprimés. Le phénomène inverse est aussi vrai en ce sens que l'inactivation d'un simple gène de virulence ne résulte pas toujours en une altération marquée de la virulence (49). Une autre limitation de STM réside dans le fait que le nombre de clones qui peut être criblé efficacement dans un groupe de mutants est restreint par le nombre de clones qui peut causer l'infection simultanément dans un seul animal (4). Si un groupe de mutants s'avère être trop complexe, les résultats risquent de varier d'un animal à l'autre et ce, pour un même groupe. Cet obstacle a d'ailleurs été contourné lors de nos manipulations en utilisant un nombre assez limité de mutants, soit douze. La technique originale de Holden propose quant à elle l'utilisation simultanée de 96 mutants. La voie d'inoculation choisie pour reproduire la maladie chez le modèle animal peut aussi présenter certaines limitations. Effectivement, certains facteurs de virulence sont actifs et dommageables que s'ils se retrouvent dans un environnement particulier, soit celui où ils causent habituellement la maladie. Par exemple, des facteurs responsables de l'adhérence d'un microorganisme à un tissu spécifique deviendront inutiles si le pathogène est inoculé dans le mauvais tissu ou dans le sang. Par conséquent, si la

bactérie en question provoque normalement une infection des voies respiratoires, les chances de causer une septicémie par celle-ci seront moindre et les doses devront être plus élevées afin de rendre l'animal malade. Polissi et son équipe ont d'ailleurs démontré ce fait en inoculant dans le sang des mutants à virulence atténuée qu'ils avaient obtenus suite à des infections des voies respiratoires (37). Les rondes de criblage ont alors révélé la présence de quelques mutants à virulence atténuée, mais les mutants de départ n'ont pas tous été confirmés, indiquant qu'il existe des facteurs de virulence spécifiques à la pneumonie (37). Le système utilisé pour App se rapproche sensiblement de l'exemple cité précédemment. App provoque des pneumonies chez son hôte naturel, le porc, lorsqu'il entre en contact avec ce dernier. Comme la souris présente des conditions d'infection similaires au porc, mais pas identiques, nous avons cru préférable d'inoculer les mutants de façon intrapéritonéale et de déclencher une septicémie chez l'animal plutôt qu'une pneumonie. Étant donné cette situation, il est raisonnable de croire que quelques facteurs de virulence aient pu nous échapper lors du criblage des mutants. En revanche, ces facteurs pourraient être isolés lors d'éventuelles rondes de criblage qui seront réalisées chez l'hôte naturel d'App, soit le porc. La voie intrapéritonéale, lorsqu'elle est utilisée comme voie alternative, présente aussi un inconvénient majeur. Elle camoufle l'identification des mutants qui jouent habituellement un rôle dans les premières étapes du processus infectieux (7). Effectivement, les gènes impliqués dans la mise en place de l'infection deviennent inutiles s'ils se retrouvent dans un environnement qui n'est pas approprié et même si l'un de ces gènes fait défaut chez un mutant, celui-ci n'en sera pas affecté et survivra. Bref, STM ne peut pas identifier tous les facteurs de pathogénicité présents chez une bactérie (10). La méthode demeure cependant un excellent compromis

lorsqu'on la compare aux autres techniques permettant la sélection de tels facteurs de virulence (tableau 2).

Avantages	Inconvénients
Criblage simultané de plusieurs mutants par sélection négative;	Complémentation par d'autres mutants lors des infections;
Identification de gènes de virulence qui sont impliqués dans différentes étapes de l'infection;	Le nombre de mutants criblés est restreint par le nombre de clones qui peut causer l'infection simultanément dans un seul animal;
Fonctionne chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives;	La voie d'inoculation doit pouvoir reproduire la maladie de façon représentative.
Interruption complète du gène touché, ce qui augmente beaucoup les chances d'inactivation.	

Tableau 2. Principaux avantages et inconvénients de la technique STM.

La survie et la multiplication à l'intérieur des poumons de l'hôte représentent la clé de la virulence d'App. À l'exception de quelques gènes, tels les gènes de toxines, la génétique des mécanismes de virulence d'App demeurent mal comprise. Dernièrement, quelques méthodes permettant l'isolement de gènes dont l'expression survient exclusivement *in*

vivo, telles STM et IVET, ont été tentées avec App et des résultats intéressants ont été obtenus. Bien que plusieurs gènes de virulence d'App aient déjà été identifiés, il est raisonnable de croire à l'existence de facteurs de virulence supplémentaires dont l'expression s'opérerait spécifiquement *in vivo*. STM est une méthode puissante qui permet l'identification de mutants ayant subi l'inactivation d'un gène essentiel à leur survie dans un hôte animal (10). Initialement, la technique fut utilisée afin d'identifier de nouveaux gènes de virulence chez le serovar Typhimurium (43), et plus récemment chez les bactéries *Staphylococcus aureus* (31), *Streptococcus pneumoniae* (37) et *Pseudomonas aeruginosa* (30). Chez ces bactéries, plusieurs facteurs de virulence avaient déjà été identifiés, ce qui a permis de valider l'approche STM en isolant des gènes de virulence déjà connus, ayant subi l'insertion d'un transposon.

Lors de cette étude, la méthode STM a été utilisée pour générer des transpositions dans le génome d'App afin d'identifier et de déterminer le rôle de gènes qui pourraient potentiellement être impliqués dans les mécanismes de virulence de la bactérie. Au total, 17 mutants à virulence atténuée ont été identifiés en utilisant cette technique. Le pourcentage de mutants à virulence atténuée obtenus à partir des mutants criblés est légèrement supérieur au ratio obtenu avec STM avec les bactéries *Salmonella typhimurium* (23), *Staphylococcus aureus* (31, 42), *Pseudomonas aeruginosa* (30) et *Vibrio cholerae* (4), soit 6,7% comparativement à 4% pour les autres. Bien que les résultats obtenus soient supérieurs à ce qui était attendu en ce qui concerne le rendement du criblage, il ne faut pas oublier qu'approximativement 90% du génome n'a toujours pas

été criblé. L'analyse éventuelle des autres mutants de la banque devrait permettre à ce pourcentage de diminuer et de se rapprocher du 4% attendu.

Les gènes inactivés des 17 mutants à virulence atténuée obtenus lors des rondes de criblage ont tous été sous-clonés et sont présentement en séquençage. Autrement dit, les régions flanquantes du transposon de chacun des mutants, qui correspondent en fait à une région plus ou moins grande du gène inactivé par l'insertion du transposon, ont été introduites dans le vecteur pUC18 *Not*I. Cette étape de clonage permettra donc de séquencer des régions des gènes inactivés à partir d'amorces internes situées dans le gène de résistance à la kanamycine du transposon. Des méthodes de séquençage à partir de l'ADN génomique du mutant et qui ne requièrent pas d'étape préalable de sous-clonage sont aussi disponibles, quoique ces méthodes sont toujours en développement. Lorsque les réactions de séquençage seront terminées, il sera alors possible d'analyser les séquences obtenues via des banques de données, telles que GenBank et GCG, et en les comparant avec des séquences de gènes déjà connues. Ainsi, en se référant aux niveaux d'homologie obtenus, il sera possible de déterminer si les gènes que nous avons isolés correspondent à des gènes déjà identifiés chez *App* ou chez d'autres genres et/ou espèces bactériennes. Dans le cas d'une absence d'homologie, nous serons en mesure d'affirmer qu'un nouveau gène de virulence d'*App* a été isolé.

Comme il a déjà été mentionné précédemment, il est raisonnable de croire à l'existence de gènes de virulence dont l'expression s'opère exclusivement *in vivo* et qui n'ont toujours pas été isolés chez *App* en raison de la complexité que ce genre de travail

requiert. STM est la méthode toute désignée afin d'accomplir ce type d'expérience. Évidemment, bien que la technique permettent l'isolement de gènes de virulence qui agissent principalement *in vivo*, les gènes identifiés peuvent être des gènes qui sont impliqués dans la synthèse de certains nutriments ou des gènes qui jouent un rôle plus spécifique dans l'établissement de la pathologie. Les gènes qui nous intéressent sont ceux qui ont un impact direct sur l'incidence de la maladie. Les gènes qu'il est possible de classer dans cette catégorie et qui ont déjà été caractérisés chez App correspondent aux gènes de LPS (39) et de toxines (47).

Un des gènes d'App qui n'a pas été isolé et qui suscite une attention très particulière est le gène qui code pour les adhésines ou pili. Bien que des pili aient déjà été observés sur des souches fraîches d'App repiquées sur des géloses au sang (50), le gène ou l'opéron qui est responsable de la synthèse de cette structure n'a toujours pas été identifié. Les pili jouent un rôle très important dans l'invasion des cellules épithéliales du système respiratoire de l'hôte chez plusieurs pathogènes, par exemple *Streptococcus pneumoniae* (3). Nous avons donc de bonnes raisons de penser qu'une telle structure pourrait être codée par le génome d'App étant donné la similarité du mode d'invasion. De plus, un opéron codant pour des adhésines a récemment été identifié chez une bactérie de la même famille qu'App, soit *Haemophilus influenzae* (38). L'opéron a été désigné *hifABCDE* et coderait pour des pili responsables de l'adhésion aux cellules respiratoires pulmonaires. Une autre cible potentielle et intéressante pour STM serait les systèmes de transport du fer. Bien qu'ils ne soient pas impliqués dans la virulence de la bactérie de façon directe, les systèmes de transport du fer sont de plus en plus étudiés parce que le fer permet aux

bactéries de croître et est impliqué dans la synthèse d'enzymes qui protègent le pathogène des réactifs oxygénés de l'hôte (27). La SOD et la peroxydase en sont de bons exemples. D'ailleurs, chez App, deux systèmes de transport du fer ont déjà été identifiés, soient Tbp (16) et plus récemment AfuABC, un système de transport de type ABC ayant comme homologue HitABC chez *Haemophilus influenzae* (5). S'ils deviennent bien compris, ces systèmes pourraient éventuellement présenter des cibles intéressantes pour des agents antimicrobiens.

Les perspectives qui concernent la suite du projet STM sont assez encourageantes. La technique a été mise au point à tous les niveaux et fonctionne adéquatement dans le modèle animal utilisé dans le cadre de cette étude, soit la souris CD-1. D'abord, les recherches seront poursuivies dans la souris et un certain pourcentage du génome d'App sera criblé. La quantité de gènes criblés dépendra des résultats obtenus. Si des gènes importants et/ou intéressants sont isolés, une attention plus particulière pourraient être attribuée à ces gènes afin de les caractériser davantage. Douze nouveaux "tags" ont aussi été dessinés, assemblés, introduits dans le vecteur pLOFΔNotI puis testés afin de s'assurer qu'ils étaient spécifiques. Au total, 28 vecteurs seront donc disponibles pour mener la technique à terme. Ces vecteurs seront utilisés pour des expériences chez le porc. Celles-ci devraient fournir des résultats très intéressants et très représentatifs puisque le modèle animal ainsi que la voie d'inoculation utilisés seront naturels pour App.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. (1995) Mini-tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene*, 59-62.
2. Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., Croughan, T. P. (1995) New mini-Tn5 derivatives for insertion mutagenesis and genetic engineering in Gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41, 1053-1055.
3. Anderson, B., Gray, B., Eden, C. S. (1988) Role of attachment for the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Acta. Otolaryngol. Suppl.*, 454, 163-166.
4. Chiang, S. L., Mekalanos, J. J. (1998) Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization. *Mol. Microbiol.*, 27 (4), 797-805.
5. Chin, N., Frey, J., Chang, C. F., Chang, Y. F. (1996) Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 143 (1), 1-6.
6. Cruijssen, T., van Leengoed, L. A., Ham-Hoffies, M., Verheijden, J. H. (1995) Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infect. Immun.*, 63 (6), 2341-2343.
7. Darwin, A. J., Miller, V. L. (1999) Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol. Microbiol.*, 32 (1), 51-62.

8. de Lorenzo, V., Herrero, M., Jacobzik, U., Timmis, K. N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.*, 172(11), 6568-6572.
9. de Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived mini-transposons. *Methods in Enzymol.*, 235, 386-405.
10. Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieille, C., Michaux-Charachon, S., O'Callaghan, D. (2000) Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect. Immun.*, 68 (3), 1297-1303.
11. Frey, J. (1992) Construction of a broad host range shuttle vector for gene cloning and expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and other *Pasteurellaceae*. *Res. Microbiol.*, 143, 263-269.
12. Frey, J. (1995) Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiol.*, 3 (7), 257-261.
13. Frey, J., Beck, M., Stucki, U., Nicolet, J. (1993) Analysis of hemolysins operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene*, 123, 51-58.
14. Frey, J., Kuhn, R., Nicolet, J. (1994) Association of the CAMP phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. *FEMS Microbiol. Lett.*, 124, 245-252.
15. Fuller, T. E., Martin, S., Teel, J. F., Alaniz, G. R., Kennedy, M. J., Lowery, D.E. (2000) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb. Pathog.*, 1, 39-51.

16. Fuller, T. E., Shea, R. J., Thacker, B. J., Mulks, M. H. (1999) Identification of *in vivo* induced genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microb. Pathog., 27 (5), 311-327.
17. Gerlach, G.-F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A. A., Willson, P. J. (1992) Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. Infect. Immun., 60, 3253-3261.
18. Gonzalez, G. C., Yu, R., Rosteck Jr., P. R., Schryvers, A. B. (1995) Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. Microbiol., 141, 2405-2416.
19. Haesebrouck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., Ducatelle, R. (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs : the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet. Microbiol., 58, 239-249.
20. Heithoff, D. M., Conner, C. P., Hanna, P. C., Julio, S. M., Hentschel, U., Mahan, M. J. (1997) Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 934-939.
21. Hensel, M. (1998) Whole genome scan for habitat-specific genes by signature-tagged mutagenesis. Electrophoresis, 19, 608-612.
22. Hensel, M., Holden, D. W. (1996) Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. Microbiol., 142, 1049-1058.
23. Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. d., Dalton, E., Holden, D. W. (1995) Simultaneous Identification of Bacterial Virulence Genes by Negative Selection. Science, 269, 400-403.
24. Herrero, M., De Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal

- insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol., 172(22), 6557-6567.
25. Higgins, R., Larivière, S., Mittal, K. R., Martineau, G. P., Rousseau, P., Cameron, J. (1985) Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. Vet. J., 26, 86-89.
 26. Jacques, M., Foiry, B., Higgins, R., Mittal, K. R. (1988) Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacteriol., 170(7), 3314-3318.
 27. Janakimaran, A., Slauch, J. M. (2000) The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol., 35 (5), 1146-1155.
 28. Jansen, R., Briaire, J., Smith, H. E., Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E. M., Gielkens, A. L. J., Smits, M. A. (1995) Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. Infect. Immun., 63 (1), 27-37.
 29. Langford, P. R., Loynds, B. M., Kroll, S. (1996) Cloning and Molecular Characterization of Cu, Zn Superoxide Dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 64 (12), 5035-5041.
 30. Lehoux, D. E., Sanschagrin, F., Lévesque, R. C. (1998) Defined oligonucleotide tag pools and PCR screening in signature-tagged mutagenesis of essential genes from bacteria. BioTechniques, 26, 473-480.
 31. Mei, J.-M., Nourbakhsh, F., Ford, C. W., Holden, D. W. (1997) Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. Mol. Microbiol., 26 (2), 399-407.

32. Mulks, M. H., Buysse, J. M. (1995) A targeted mutagenesis system for *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene*, 165, 61-66.
33. Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., Serrano, J. J., Garcfa, C., de la Garza, M. (1994) Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.*, 58, 83-86.
34. Niven, D. F., Donga, J., Archibald, F.S. (1989) Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol. Microbiol.*, 3 (8), 1083-1089.
35. Paradis, S. E., Dubreuil, J. D., Gottschalk, M., Archambault, M., Jacques, M. (1999) Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptor. *Curr. Microbiol.*, 39 (6), 313-320.
36. Perry, M. B. (1990) Structural analysis of the lipopolysaccharide of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 10. *Biochem. Cell. Biol.* 68, 808-810.
37. Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., Simon, D. (1998) Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 66 (12) : 5620-5629.
38. Read, T. D., Satola, S. W., Farley, M. M. (2000) Nucleotide sequence analysis of hypervariable junctions of *Haemophilus influenzae* pilus gene clusters. *Infect. Immun.*, 68 (12), 6896-6902.
39. Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Kobisch, M., Frey, J., Gottschalk, M., Jacques, M. (2000) Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb. Pathog.*, 28 (5), 279-289.

40. Rycroft, A. N., Williams, D., Cullen, J. M., MacDonald, J. (1991) The cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleurotoxin) is distinct from the haemolysin and is associated with a 120 kDa polypeptide. J. Gen. Microbiol., 137, 561-568.
41. Sato, S., Takamatsu, N., Okahashi, N., Matsunoshita, N., Inoue, M., Takehara, T., Koga, T. (1992) Construction of mutants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* defective in serotype b-specific polysaccharide antigen by insertion of transposon Tn 916. J. Gen. Microbiol., 138, 1203-1209.
42. Schwan, W. R., Coulter, S. N., Ng, E. Y. W., Langhorne, M. H., Ritchie, H. D., Brody, L. L., Westbrook-Wadman, S., Bayer, A. S., Folger, K. R., Stover, C. K. (1998) Identification and characterization of the PutP proline permease that contributes to in vivo survival of *Staphylococcus aureus* in animal models. Infect. Immun., 66 (2), 567-572.
43. Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. W. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 2593-2597.
44. Sirois, M., Lemire, E. G., Lévesque, R. C. (1991) Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 29 (6), 1183-1187.
45. Suk, K., Das, S., Sun, W., Jwnag, B., Barthold, S. W., Flavell, R. A. et Fikrig, E. (1995) *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in the infected host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 4269-4273.
46. Tascon, R. I., Rodriguez-Ferri, E. F., Gutierrez-Martin, C. B., Rodriguez-Barbosa, I., Berche, P., Vazquez-Boland, J. A. (1993) Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. J. Bacteriol., 175(17), 5717-5722.

47. Tascon, R. I., Vazquez-Boland, J. A., Gutiérrez-Martin, C. B., Rodriguez-Barbosa, I., Rodriguez-Ferri, E. F. (1994) The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* : evidence from mutational analysis. *Mol. Microbiol.*, 14 (2), 207-216.
48. Tascon, R. I., Vazquez-Boland, J. A., Gutiérrez-Martin, C. B., Rodriguez-Barbosa, J. I., Rodriguez-Ferri, E. F. (1996) Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiologia SEM*, 12.
49. Tsolis, R. M., Townsend, S. M., Miao, E. A., Miller, S. I., Ficht, T. A., Adams, L. G., Bäumler, A. J. (1999) Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype Typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.*, 67 (12), 6385-6393.
50. Utrera, V., Pijoan, C. (1991) Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Rec.*, 128, 357-358.
51. Wang, J., Mushegian, A., Lory, S., Jin, S. (1996) Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by in vivo selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 10434-10439.
52. Ward, C. K., Lawrence, M. L., Veit, H. P., Inzana, T. J. (1998) Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a : concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.*, 66 (7), 3326-3336.
53. West, S. E. H., Romero, M. J. M., Regassa, L. B., Zielinski, N. A., Welch, R. A. (1995) Construction of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-*Escherichia coli* shuttle vectors : expression of antibiotic-resistance genes. *Gene*, 160, 81-86.